

NILO HOLZCHUH

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado, apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, área de Oftalmologia FCM/UNICAMP, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas, Área de Oftalmologia do aluno Nilo Holzchuh.

Campinas, 01 de setembro de 1999.

Prof. Dr. Milton Ruiz Alves
Orientador



EFEITOS DO USO TÓPICO DA MITOMICINA C NO EPITÉLIO CORNEANO DE COELHOS

Tese de Doutorado apresentada
ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências Médicas, Área de Concentração
em Oftalmologia, na Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Doutor
em Ciências Médicas

CAMPINAS - UNICAMP

1999

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

7071066

NILO HOLZCHUH

**EFEITOS DO USO TÓPICO DA MITOMICINA C
NO EPITÉLIO CORNEANO DE COELHOS**

Tese de Doutorado apresentada
ao Curso de Pós - Graduação em Ciências
Médicas, Área de Concentração em
Oftalmologia, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de
Doutor em Ciências Médicas.

ORIENTADOR:
Prof. Dr. MILTON RUIZ ALVES

CAMPINAS - UNICAMP

1999

UNIDADE	DC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMEO BC/	39572
PROC.	229199
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02-12-98
V.º CPD	

CM-00137163-9

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

H749e Holzchuh, Nilo

Efeitos do uso tópico da mitomicina C no epitélio corneano de coelhos / Nilo Holzchuh. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientador : Milton Ruiz Alves, Carlos Eduardo Leite Arieta
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Toxicidade - testes. 2. Microscopia médica. 3. Córnea. I. Milton Ruiz Alves. II. Carlos Eduardo Leite Arieta. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. V. Título.

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Milton Ruiz Alves

Membros:

1. *— no 10 —*

2. *Zeze Sme*

3. *Nelson Pires Jr*

4. *Chieira*

5. *Walter F. Machado*

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, área de concentração em Oftalmologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 05/09/99

ORIENTADOR

Prof. Dr. Milton Ruix Alves

DEDICATÓRIA

*À minha esposa Marlene e aos meus filhos
Reinaldo e Ricardo, pelo amor, dedicação e
compreensão, razões da minha vida.*

*Aos meus pais, Franz e Waldomira, meus
padrinhos Antonio (in memoriam) e Aurora,
responsáveis pela minha formação moral e ética, sempre
incentivando nos momentos mais difíceis.*

AGRADECIMENTOS

Quero aqui expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, permitindo seu planejamento, realização e conclusão, em especial as seguintes pessoas:

Prof. Dr. Milton Ruiz Alves, Prof. Livre Docente da Faculdade de Medicina da USP, pela preciosa orientação, ensinamentos, exemplo de dedicação e conhecimento científico em nosso meio. Muito mais que um orientador, um amigo presente em todas as horas da confecção deste trabalho.

Prof. Dr. Newton Kara-José, Prof. Titular e Chefe do Departamento de Oftalmologia da FCM – UNICAMP e FM-USP, pela amizade, estímulo e apoio. Exponente da oftalmologia brasileira, responsável direto pelo que sou na carreira, amigo incansável, nunca esmorece e sempre incentiva este comandado a novas conquistas.

Prof. Dr. Geraldo Vicente de Almeida, Prof. Dr. do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, condutor da nossa formação na especialidade, amigo desde que adentramos à oftalmologia e um dos responsáveis pelas nossas condutas ética, moral e profissional dentro da profissão.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Leite Arieta, Prof. Dr. do Curso de Pós-Graduação da FCM-UNICAMP, Área de Oftalmologia, pela amizade, estímulo, perseverança e ajuda em todas as fases deste trabalho. Amigo inseparável, honestidade a toda prova, sempre pronto a auxiliar e se dedicar no que for preciso.

Profa. Dra. Marlene Pezzutti Holzchuh, Profa. Dra. Chefe da Disciplina de Anestesiologia da FMVZ-USP, sempre ao meu lado, em todas as fases difíceis e longas desta tarefa, apoiando e incentivando, com compreensão, paciência e palavras de carinho.

Prof. Dr. José Vassalo, Chefe do Departamento de Anatomia Patológica da FCM-UNICAMP, pela dedicação, presteza, leitura das lâminas de imuno-histoquímica e elaboração de suas fotos.

Prof. Dr. Paulo Hilário N. Saldiva, pela permissão e possibilidade da realização deste trabalho.

Prof. Dr. Ralph Cohen, Chefe do Serviço de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, pelo apoio e sugestões apresentadas.

Dra. Ruth M.Santo, pelo auxílio, ensinamentos e colaboração.

Dra. Maria Cristina N. Dantas e Dr. Paulo E. C.Dantas, pelo auxílio, dedicação e amizade.

Farmacêutico Acácio Alves de Souza Lima Filho, pelo fornecimento e dedicação na manipulação da mitomicina C e todos os outros colírios.

Técnica Glauce Aparecida Pinto, responsável pelo Laboratório de Imuno-histoquímica e Hibridação do CAISM, pela confecção das lâminas de imuno-histoquímica.

Técnica Miriam Lemos, pela dedicação, paciência e presteza na leitura das lâminas de morfometria.

As técnicas Cássia e Mary do HC-USP São Paulo, pela elaboração e processamento das lâminas e blocos do meu material.

As estaticistas Sandra Regina Malagutti e Paula Goldenstein Strassmann, pelos cálculos estatísticos.

Wagner José da Silva e todos os integrantes do Departamento de Áudio-Visual da FCM-UNICAMP.

Sandra Lúcia Pereira, bibliotecária da FCM-UNICAMP, pela paciência e dedicação.

Profa. Maria Auxiliadora Fontana Baseio, pela correção ortográfica deste trabalho.

Reinaldo Holzchuh, Ricardo Holzchuh e Rony C. Preti, pela ajuda na confecção do texto em inglês e confecção da arte final da impressão.

Antonia Cecília de Campos, secretária do núcleo de prevenção de cegueira, amiga dedicada, pela ajuda facilitando todas as fases deste projeto.

Ao serviço de Oftalmologia da UNICAMP, que possibilitou a realização desta tese.

Ao serviço de Anestesiologia da FMVZ-USP e a todos os seus funcionários, que permitiram a realização experimental da tese.

Ao serviço de Oftalmologia da Universidade de São Paulo, que proporcionou a oportunidade para confecção deste estudo.

Professores, Residentes e Funcionários do Departamento de Oftalmo/Otorrino da UNICAMP, que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos colegas e principalmente a minha equipe da Santa Casa de São Paulo, que contribuíram para elaboração desta tese.

Aos colegas do Departamento de Oftalmo/Otorrino da FM-USP, que incentivaram a desenvolver esta tese.

Aos colegas da UNICAMP, pela paciência carinho e estímulo durante toda fase de realização do estudo.

Dr. Geraldo V. Almeida, Dr. Luis Amador Aguiar, Dr. Walter Dualibi, Dr. Wilmar Roberto Silvino e demais colegas do Centro Oftalmológico Pacaembú, pela paciente compreensão e colaboração durante as fases de confecção deste trabalho.

As minhas secretárias diretas, Clotilde B. Loes e Lúcia Listo Couto, pela paciência, compreensão e ajuda nesta árdua fase.

a todos, o meu sincero

muito obrigado

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTAS

Tabelas.....I

Figuras.....II

Abreviaturas.....III

RESUMO.....IV

1. INTRODUÇÃO.....01

1.1. Mitomicina C.....03

1.2. Epitélio corneano.....15

1.3. Análise morfométrica e imuno-histoquímica.....19

2. OBJETIVOS.....22

3. MATERIAL E MÉTODOS.....23

3.1. Material.....23

3.1.1. Animais.....23

3.1.2. Soluções utilizadas.....24

3.1.3. Drogas utilizadas para anestesia.....27

3.1.4. Exame histopatológico.....27

3.1.5. Exame imuno-histoquímico.....27

3.2. Métodos.....	29
3.2.1. Lotes de animais.....	29
3.2.2. Delineamento experimental.....	29
3.2.2.1. Administração de colírios.....	29
3.2.2.2. Exames clínicos de controle.....	30
3.2.2.3. Colheita de material.....	31
3.2.2.4. Remoção de área central do epitélio da córnea.....	32
3.2.3. Análises laboratoriais.....	33
3.2.3.1. Processamento histopatológico.....	33
3.2.3.2. Processamento imuno-histoquímico.....	34
3.2.3.3. Análise histopatológica.....	37
3.2.3.4. Análise morfométrica.....	37
3.2.3.5. Análise do padrão de diferenciação - imuno-histoquímica.....	39
3.2.4. Tratamento estatístico.....	40
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Análise biomicroscópica.....	41
4.2. Análise histopatológica.....	41
4.3. Análise morfométrica do epitélio corneano.....	41
4.3.1. Área estimada do epitélio na região do limbo e central da córnea.....	42
4.3.2. Número estimado de núcleos na região do limbo e central da córnea.....	42
4.3.3. Número estimado de núcleos redondos na região do limbo e central da córnea.....	42

4.3.4. Valor estimado da relação núcleo-citoplasma na região do limbo e central da córnea.....	43
4.3.5. Área estimada da célula epitelial na região do limbo e central da córnea.....	44
4.3.6. Área estimada do núcleo da célula epitelial na região do limbo e central da córnea.....	44
4.3.7. Área estimada do citoplasma da célula epitelial na região do limbo e central da córnea.....	44
4.4. Análise imuno-histoquímica.....	45
4.5. Avaliação dos animais submetidos a remoção da área central do epitélio da córnea.....	45
5. DISCUSSÃO.....	75
6. CONCLUSÕES.....	84
SUMMARY.....	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXO 1 - peso dos coelhos.....	106
ANEXO 2 – avaliação biomicroscópica – hiperemia.....	107
ANEXO 3 – morfometria.....	108
ANEXO 4 – imuno-histoquímica.....	115

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

RELAÇÃO DE TABELAS

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1 - área do epitélio - região do limbo.....	46
Tabela 2 - área do epitélio - região central.....	47
Tabela 3 - número de núcleos - região do limbo.....	48
Tabela 4 - número de núcleos - região central.....	49
Tabela 5 - número de núcleos redondos - região do limbo.....	50
Tabela 6 - número de núcleos redondos - região central.....	51
Tabela 7 - relação núcleo-citoplasma - região do limbo.....	52
Tabela 8 - relação núcleo-citoplasma - região central.....	53
Tabela 9 - área da célula epitelial - região do limbo.....	54
Tabela 10 - área da célula epitelial - região central.....	55
Tabela 11 - área do núcleo - região do limbo.....	56
Tabela 12 - área do núcleo - região central.....	57
Tabela 13 - área do citoplasma - região do limbo.....	58
Tabela 14 - área do citoplasma - região central.....	59

RELAÇÃO DE GRÁFICOS

RELAÇÃO DE GRÁFICOS – QUADRO - FIGURAS

Gráfico 1 - área do epitélio - região do limbo.....	60
Gráfico 2 - área do epitélio - região central.....	61
Gráfico 3 - número de núcleos - região do limbo.....	62
Gráfico 4 - número de núcleos - região central.....	63
Gráfico 5 - número de núcleos redondos - região do limbo.....	64
Gráfico 6 - número de núcleos redondos - região central.....	65
Gráfico 7 - relação núcleo-citoplasma - região do limbo.....	66
Gráfico 8 - relação núcleo-citoplasma - região central.....	67
Gráfico 9 - área da célula epitelial - região do limbo.....	68
Gráfico 10 - área da célula epitelial - região central.....	69
Gráfico 11 - área do núcleo - região do limbo.....	70
Gráfico 12 - área do núcleo - região central.....	71
Gráfico 13 - área do citoplasma - região do limbo.....	72
Gráfico 14 - área do citoplasma - região central.....	73
 QUADRO 1 - avaliação imuno-histoquímica.....	74
 FIGURA 1 – fotografia de cortes histológicos do limbo – AE ₁	118
 FIGURA 2 – fotografia de cortes histológicos da córnea – AE ₅	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	- complexo redutor
°C	- grau Celsius
CC	- grupo controle
DAB	- diaminobenzedina
DNA	- ácido desoxirribonucleico
d	- dias
et al.	- e outros colaboradores
g	- grama
(G0)	- fase não proliferativa
(G1)	- fase pré-sintética
(G2)	- fase pós-sintética
Graf.	- gráfico
H₂O₂	- água oxigenada
Inc.	- Incorporation
Kg	- quilograma
Lab.	- laboratório
L.I.M.	- laboratório de investigação médica
Ltda	- limitada
m	- mitose
mg	- miligrama
ml	- mililitro
mOsm/l	- miliosmol por litro
mm	- milímetro
MMC	- mitomicina C
n°	- número
(-)	- negativo
(+)	- positivo
%	- porcentagem
obs.	- observação
OD	- olho direito
OE	- olho esquerdo
osml	- osmolaridade
p	- probabilidade de erro
PBS	- solução tampão de fosfato
pH	- potencial hidrogeniônico
prod.	- produtos
RNA	- ácido ribonucleico
S	- fase de síntese
tab.	- tabela
μm²	- micrômetro ao quadrado
UNICAMP	- Universidade Estadual de Campinas
USA	- United States of América

RESUMO

RESUMO

O objetivo desta presente pesquisa foi avaliar os efeitos do uso tópico da mitomicina C a 0,02%, no epitélio íntegro da córnea de coelhos, sob o ponto de vista clínico, histopatológico e imuno-histoquímico. A mitomicina C (olhos esquerdo) e água destilada (olhos direito, controle) foram instiladas, 4 vezes ao dia, por 14 dias, nos olhos de 28 coelhos, em superfície ocular íntegra.

A superfície ocular foi avaliada por exames biomicroscópicos seriados, durante os dias de instilação da droga. Os animais foram sacrificados no 15º, 50º e 100º dia de experimento. O exame histopatológico do epitélio corneano foi complementado por análise morfométrica, que pelo método de contagens de pontos, estudou área do epitélio, número de núcleos, relação núcleo-citoplasma, área da célula epitelial, área do núcleo e área do citoplasma, na região do limbo e central da córnea. O exame imuno-histoquímico do epitélio corneano foi realizado pelo emprego dos anticorpos monoclonais (AE1 e AE5) que reagem com as citoceratinas do epitélio da córnea.

O uso de mitomicina C desencadeou discreta hiperemia conjuntival após o terceiro dia de instilação, desaparecendo 7 dias após a suspensão da droga. Não apresentou outro sinal clínico detectável na biomicroscopia. Não desencadeou alterações histopatológicas no epitélio corneano, observando-se a continuidade do epitélio, as células epiteliais se apresentaram dispostas de maneira ordenada, com número de camadas obedecendo a maturação normal e ausência de atipia celular. A análise morfométrica determinou alterações significativas em diferentes

estruturas do epitélio, na região do limbo e central da córnea, principalmente nas áreas estimadas do epitélio, do citoplasma e do número de núcleos, verificando-se uma hipertrofia da célula epitelial, redução da relação núcleo-citoplasma e diminuição do número de núcleos. Estes valores voltaram próximos ao nível controle no 100º dia de avaliação. O uso da mitomicina C a 0,02%, não influenciou no padrão de diferenciação da célula epitelial da córnea.

Os resultados desta investigação demonstraram baixo potencial tóxico do uso da mitomicina C, em superfície ocular íntegra de coelhos, nessa dosagem e concentração.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A utilização da mitomicina C (MMC), na oftalmologia, tem se difundido nos últimos anos devido aos resultados favoráveis apresentados nos diversos segmentos da especialidade.

Sua aplicação é encontrada na prevenção de recorrência pós-operatória do pterígio (CARDILLO et al., 1995a; CARDILLO et al., 1995b; EWING-CHOW et al., 1992; FRUCHT-PERY & ILSAR, 1994; FRUCHT-PERY et al., 1994; KUNITOMO & MORI, 1963; MORI et al., 1968; MOROI & LICHTER, 1996; PANDA et al., 1998; POTERIO et al., 1998; ROSENTHAL et al., 1993; SINGH et al., 1988; SINGH et al., 1990; SUGAR, 1992), na manutenção de fístulas antiglaucomatosas funcionantes (CARVALHO et al., 1993; CHEN, 1983; CHEN & TSENG, 1995; COSTA et al., 1993a, COSTA et al., 1993b, COSTA et al., 1996; KHOURY et al., 1998; KITAZAWA, et al., 1993; MANDIA Jr., 1997; MERMOUD et al., 1993; MOROI & LICHTER, 1996; PALMER, 1991; PASQUALE et al., 1992; PERKINS et al., 1998; SHIELDS et al., 1993; SKUTA et al., 1992; STONE et al., 1998; TAKAHASHI et al., 1995), como auxiliar nas cirurgias de implante de Molteno em pacientes glaucomatosos (PERKINS et al., 1995; SUSANNA Jr. et al., 1994), na prevenção de fibrose decorrente de cirurgia de estrabismo (CRUZ, 1996; MINGUINI, 1999; OH et al., 1995; URBAN & KAUFMAN, 1994), no tratamento de neoplasia intra-epitelial corneana (FRUCHT-PERY & ROZENMAN, 1994; FRUCHT-PERY et al., 1997; WILSON et al., 1997) e conjuntival (FINGER &

McCORNICK, 1994; GROSSNIKLAUS & AABERG, 1997) na prevenção de opacificação capsular posterior do cristalino (HAUS & GALAND, 1996), na redução de formação de cicatrizes depois da ceratectomia fotorefrativa por excimer laser (SCHIPPER et al., 1997; TALAMO et al., 1991), na manutenção da osteotomia nas cirurgias de dacriocistorinostomia (KAO et al., 1997) e também no tratamento de penfigóide ocular cicatricial (DONNENFELD et al., 1999).

Porém, são relatadas complicações após a utilização dessa droga nos diversos segmentos do globo ocular, entre elas, citam-se ulceração escleral (DUNN et al., 1991; EWING-CHOW et al., 1992), defeitos epiteliais corneais, necrose de córnea e reação inflamatória intra-ocular (FUJITANI et al., 1993; ROSENTHAL et al., 1993; RUBIENFELD et al., 1992), atalamia, catarata, descolamento de coróide, endoftalmite tardia, alterações advindas da hipotonia e maculopatia após cirurgias antiglaucomatosas complementadas com uso de MMC (COSTA et al., 1993a; COSTA et al., 1993b; FIGUEIREDO et al., 1996; HIGGINBOTHAM et al., 1996; HUTCHINSON et al., 1994; JAMPEL et al., 1992, MÉGEVAND et al., 1995; MERMOUD et al., 1993; MOSTER et al., 1993; ORAM et al., 1995; SUÑER et al., 1997). Nas áreas submetidas a excimer laser de fluoreto-argônio para cirurgias de ceratectomia fotorefrativa, pode ocorrer opacidade difusa no estroma com uso da MMC (BERGMAN & SPIGELMAN, 1994; McDONALD et al., 1990; TALAMO et al., 1991).

Com o aumento de seu emprego, as complicações são mais freqüentes e graves, tornando imperioso o conhecimento melhor da droga e sua iatrogenia. Para evitar reações nefastas às indicações da MMC, enfatiza-se a necessidade de mais estudos para avaliação de sua segurança.

1.1. MITOMICINA C

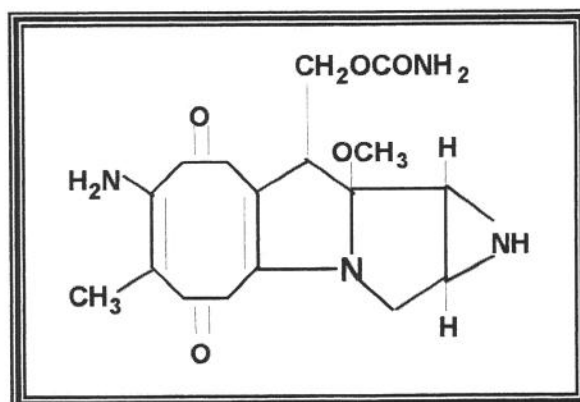
As mitomicinas A e B foram inicialmente obtidas do *Streptomyces caespitosus*, por Hata, no Japão (HATA et al., 1956). Em 1958, WAKAKI et al. isolaram a mitomicina C da fermentação do caldo de cultura do mesmo microorganismo. A mitomicina C se diferencia das mitomicinas A e B pelas suas características de absorção da luz ultravioleta, solubilidade em solventes orgânicos, forte estabilidade a temperaturas elevadas e comportamento eletroforético.

Na forma de cristais, de cor azul-violeta, é estável por 4 horas, a 100°C, sem perda de atividade, mostra-se solúvel em água e solventes orgânicos, formando uma solução cinza azulada que é inativada pela luz visível. Dissolvida em água destilada a 0,4 mg/ml, apresenta pH entre 6 e 8, demonstra estabilidade por 14 dias em temperaturas de 2 a 8°C (WAKAKI et al., 1958).

Há muitos anos a MMC vem sendo estudada, mas só na década de 70, seu uso clínico tornou-se rotineiro. Esta substância possui atividade contra vários tipos de tumores no ser humano, é eficaz no tratamento de ampla gama de

neoplasias tais como corioepitelioma, sarcoma de células reticulares, seminoma e tumores epiteliais. Seu uso clínico inclui os carcinomas da cavidade bucal, pulmão, intestino e estômago (SZYBALSKI & IYER, 1967). Como antibiótico, é eficaz nas infecções por bactérias gram(+) e gram(-), como também bacilos, riquetsias e vírus (CROOKE & BRADNER, 1976).

FÓRMULA ESTRUTURAL



A estrutura química da MMC contém um grupo aziridina, um grupo quinona bem como um anel mitosano e, cada um destes participa nas reações de alquilação com o DNA. O grupo quinona é essencial para sua atividade antineoplásica. A droga atua por reação de alquilação biorredutora e pode ser seletivamente tóxica para células hipóxicas (CALABRESI & PARKS Jr., 1987; CROOKE & BRADNER, 1976; KENNEDY et al., 1980). Após redução enzimática intracelular ou química espontânea da quinona e perda do grupo metóxi, a MMC torna-se agente alquilante bifuncional ou trifuncional e inibe a síntese de DNA,

degradando o DNA pré-formado e causando lise do núcleo celular em concentrações 30 a 100 vezes maiores que a necessária para inibir a síntese de DNA. Além disso, provoca quebra monofilamentar do DNA e dos cromossomos. Inibe também a síntese de RNA (CALABRESI & PARKS Jr., 1987; CHABNER et al., 1996; CROOKE & BRADNER, 1976) e tem efeito direto nos cromossomos, produzindo alterações e aberrações (NOWELL, 1964).

Os efeitos quimioterápicos e citotóxicos são diretamente relacionados com a alquilação do DNA. O átomo de nitrogênio₇ da guanina é particularmente suscetível à formação de um laço covalente, tanto com agentes alquilantes monofuncionais quanto bifuncionais e, pode representar o alvo-chave que determina os efeitos biológicos destes agentes. Entretanto, a citotoxicidade dos alquiladores bifuncionais correlaciona-se estreitamente com as ligações cruzadas entre os filamentos do DNA (CHABNER et al., 1996).

É essencial a compreensão da cinética do ciclo celular para uso apropriado da atual geração de drogas antineoplásicas (CALABRESI & PARKS Jr., 1996). Muitos dos mais potentes agentes citotóxicos atuam em fases específicas do ciclo celular e, portanto, têm atividade apenas contra células que estão em processo de divisão. Por esse motivo, as neoplasias malignas humanas, atualmente mais suscetíveis às medidas terapêuticas, são as que têm grande fração de crescimento, isto é, alta porcentagem de células em processo de divisão. Por outro lado, os tumores de crescimento lento, com pequena fração de desenvolvimento, em geral, não respondem as drogas citotóxicas.

Embora existam diferenças na duração do ciclo celular entre células de vários tipos, todas apresentam padrão similar durante o processo de divisão. Isto pode ser caracterizado do seguinte modo: fase pré-sintética (G_1), síntese do DNA (S), fase pós-sintética (G_2) – intervalo após o término da síntese de DNA e mitose (M): quando a célula em G_2 divide-se em 2 células filhas que entram em G_1 . Cada célula entra novamente no ciclo ou passa por período não proliferativo, denominado G_0 (CALABRESI & PARKS Jr., 1996).

As células de certos tecidos especializados podem diferenciar-se em funcionais que não são mais capazes de divisão. Muitas delas, especialmente as de tumores de crescimento lento, podem permanecer no estado G_0 por períodos prolongados.

A maioria das drogas antineoplásicas atua especificamente nos processos tais como síntese de DNA, transcrição ou funcionamento do fuso mitótico e são consideradas específicas do ciclo celular. Segundo CROOKE & BRADNER (1976), a inibição da síntese de DNA e diminuição do número de mitoses ocorrem quando a MMC é administrada em qualquer fase do ciclo celular, com ação mais proeminente durante a fase final de G_1 e o início de S.

A MMC inibe a proliferação de fibroblastos de animais e de seres humanos em cultura (CHEW et al., 1992; JAMPEL, 1992; LEE et al., 1990; PINILLA et al., 1998; WOO et al., 1997; YAMAMOTO et al., 1990), sendo o efeito dose dependente. A droga tem atividade contra todas as células, independentemente da fase do ciclo celular. Mesmo células que não estejam sintetizando DNA

poderão ser afetadas pela MMC e não proliferarem após exposição (JAMPEL, 1992; KHAW et al., 1992; KHAW et al., 1993).

CHEW et al.(1992) verificaram que o fechamento de feridas epiteliais logo após abrasão da superfície corneana desencadeava uma complexa série de alterações celulares no estroma. Através da microscopia de transmissão de elétrons e microscopia de luz observaram que os ceratócitos do estroma anterior apresentavam proeminente processo citoplásmico e granulosidade no prazo de uma hora após a injúria. A degeneração celular prosseguia rapidamente, com quase completa depleção destes ceratócitos por 6 a 12 horas, mas a regeneração ocorria de 24 a 48 horas. Os autores confirmaram estes achados in-vivo, em coelhos, através da exploração em série pelo microscópio de luz confocal. A capacidade da secção óptica deste instrumento permitiu-lhes demonstrar, em 3ª dimensão, a formação do processo de fibroblasto, sua subsequente condensação e danos por exames sequenciais no mesmo animal. Usando este método, puderam investigar a citotoxicidade na córnea pelo agente antimitótico MMC e o antagonista muscarínico-sulfato de atropina. A MMC conduziu a depleção irreversível dos ceratócitos mesmo depois de 4 dias de observação e o sulfato de atropina atenuou a reação celular da ferida.

O uso da MMC tópica para prevenir recidiva após cirurgia do pterígio aumentou desde sua introdução no Japão por KUNITOMO & MORI (1963) e sua subsequente popularização nos Estados Unidos por SINGH et al. (1988). A recidiva após cirurgia de pterígio é alta variando de 24% a 89%, justificando o

emprego de antiproliferativos durante o pós-operatório (CHEN et al., 1995, FRUCHT-PERY et al., 1997; SUGAR, 1992). A eficácia e segurança de aplicação intra-operatória da MMC, na concentração diluída de 0,02 mg/ml, com esponja estéril de 5x5 mm, por 3 minutos, sobre a esclera, nas cirurgias para pterígio, diminuem a taxa de recidiva do pterígio e minimiza a toxicidade corneoescleral (PANDA et al., 1998).

CARDILLO et al. (1996) verificaram a eficácia do uso da MMC na prevenção de recidiva após cirurgia de pterígio. A MMC nas doses de 0,02% e 0,04% foi utilizada por 2 tipos de administrações diferentes, aplicação intra-operatória única e instilação na forma de colírio, 3 vezes ao dia, durante 7 dias.

O uso de agentes antiproliferativos para prevenir fibrose após cirurgias oculares tem revolucionado as cirurgias filtrantes de pacientes portadores de glaucoma de alto risco (PALMER, 1991; KHOURY et al., 1998; ROBIN et al., 1997). O pioneiro do uso da MMC nestes casos foi CHEN (1983), que utilizou dose única desta droga, intra-operatória, durante 5 minutos. Este regime tem ganho em popularidade por causa da facilidade de aplicação, ausência de toxicidade corneana e melhora a longo prazo do controle da pressão intra-ocular, principalmente quando comparado ao regime do uso pós-operatório da injeção do 5-fluorouracil (KHAW, 1993). O emprego do 5-fluorouracil apresenta as seguintes desvantagens: necessidade de repetidas injeções subconjuntivais e toxicidade corneana (COSTA et al., 1993b; SKUTA et al., 1992; YEATTS et al., 1995). ANDO et al. (1992) constataram que MMC é pelo menos 125 vezes mais potente que o 5-

fluorouracil para inibir a regeneração de células epiteliais previamente removidas de córneas de coelhos.

Recentemente, o uso tópico de MMC vem se constituindo em nova opção terapêutica no tratamento das neoplasias intra-epiteliais da córnea e conjuntiva (FINGER & McCORNICK, 1994; FRUCH-PERY & ROZENMAN, 1994; FRUCH-PERY et al., 1997; HEIGLE et al., 1997; KATO et al., 1996; TSENG et al., 1997; USUBA & BATTISTELLA, 1999; WILSON et al., 1997) e de melanose conjuntival primária adquirida com atipia (FRUCH-PERY & PE'ER, 1996), contrapondo-se ao tratamento cirúrgico.

As displasias e neoplasias intra-epiteliais conjuntivais e corneais são lesões raras que geralmente envolvem o limbo corneoescleral e tendem a crescer sobre a córnea. Elas englobam um número grande de anormalidades epiteliais que vão desde moderada displasia até carcinoma *in situ*. As displasias e neoplasias intra-epiteliais conjuntivais e corneais são lesões progressivas lentas com baixo potencial de malignidade (ERIE et al., 1986; TSENG et al., 1997). Mas, se não forem tratadas, podem ocasionar dor local e acentuada perda de visão. Após o diagnóstico, é indicada a realização de uma intervenção cirúrgica e logo após a excisão, a lesão tem demonstrado alta porcentagem de recidiva, de 30 a 45% (ERIE et al., 1986). A recidiva geralmente ocorre devido à incompleta excisão do tumor. O uso concomitante da crioterapia (FRAUNFELDER & WINGFIELD, 1983), beta irradiação (ELKON & CONSTABLE, 1979; JONES et al., 1991), uréia tópica

(DANOPOULUS et al., 1979) e imunoterapia (FERRY et al., 1976) depois da excisão tem sido utilizado para reduzir a taxa de recidiva.

Estas modalidades de tratamento, entretanto, estão associadas a grande variedade de complicações como ulceração escleral, escarificação da conjuntiva e córnea, formação de membranas retrocorneais e catarata (ELKON & CONSTABLE, 1979; TSENG et al., 1997).

O primeiro caso do uso tópico da MMC para o tratamento de tumores da superfície corneo-conjuntival, foi noticiado por FINGER & McCORNICK (1994). Utilizaram MMC na concentração 0,04%, 4 vezes ao dia, durante 28 dias consecutivos, para reduzir, por quimioterapia, um melanoma maligno da conjuntiva, antes de ser extirpado. FRUCHT-PERY & ROZENMAN (1994) trataram 4 pacientes portadores de displasia e neoplasia epitelial corneana envolvendo o eixo visual com MMC tópica a 0,02%, 4 vezes ao dia, durante 10 a 22 dias. FRUCHT-PERY et al. (1997) empregaram MMC tópica a 0,02%, 4 vezes ao dia, durante 14 dias, em 17 pacientes portadores de neoplasia intraepitelial corneo-conjuntival. Em alguns pacientes a lesão diminuiu de tamanho mas não desapareceu, então utilizaram uma segunda e até terceira aplicação de MMC a 0,02% ou 0,04%, por mais 14 dias. A lesão foi erradicada em 13 pacientes, 2 tiveram diminuição do tumor e 2 não responderam ao tratamento. Os autores enfatizaram que a vantagem do uso deste tipo de tratamento, em relação ao procedimento cirúrgico, é ausência de trauma na porção central da córnea.

HEIGLE et al. (1997) e TSENG et al.(1997) empregaram MMC tópica a 0,04%, no tratamento de neoplasia epitelial conjuntival e corneana recorrente e, observaram que houve uma acentuada regressão do tumor sem recidiva, até 10 meses após o início do tratamento. FRUCHT-PERY et al. (1997) e TSENG et al.(1997), relataram que durante o período de instilação da MMC, alguns pacientes apresentaram grau médio de hiperemia conjuntival e dor ocular.

WILSON et al. (1997) avaliaram a eficácia do uso tópico da MMC na concentração 0,04%. Eles trataram 7 olhos de 7 pacientes com displasias e neoplasias intra-epiteliais conjuntivais e corneais, com uso tópico de 1 gota de MMC à 0,04%, 4 vezes ao dia, por 7 dias, em semanas alternadas. Antes do início do tratamento, o diagnóstico da displasia ou neoplasia epitelial foi confirmado por exame histopatológico. Obtiveram, como resultado, que 6 olhos dos 7 pacientes tiveram completa regressão clínica da displasia ou neoplasia epitelial conjuntival e corneana e, somente 1 olho, de 1 paciente, teve regressão clínica parcial. Os autores também puderam observar que durante a terapia do uso tópico da MMC, os pacientes apresentaram desconforto ocular transitório, lacrimejamento, fotofobia, ceratopatia epitelial puntata e transitória injeção conjuntival. Todos os efeitos colaterais desapareceram após 1 semana de interrupção do uso tópico da MMC, com exceção da ceratopatia epitelial puntata que persistiu por mais 3 semanas. Não foi observado nenhuma redução permanente na acuidade visual.

A melanose primária adquirida é uma pigmentação superficial causada por melanócitos intra-epiteliais da conjuntiva. Se esta melanose não é acompanhada de atipia, é considerada doença benigna, mas, quando há atipia, indica alto risco de gerar melanoma e necessita ser eliminada. Vários tratamentos para melanose primária adquirida com atipia foram realizados, como crioterapia, terapia a laser, excisão, mas as lesões podiam retornar ocasionando várias complicações. FRUCHT-PERY & PE'ER (1996) trataram uma paciente de 63 anos de idade, portadora de melanose primária adquirida com acentuada atipia, com MMC 0,02% tópica, por 2 semanas e MMC 0,04%, por mais 2 semanas consecutivas. Depois da primeira série de administração de MMC observaram diminuição da pigmentação conjuntival e os estudos histológicos revelaram redução do grau de atipia. Depois da segunda aplicação de MMC, a pigmentação desapareceu, exceto pequena mancha que continha somente alguns melanócitos típicos. Os achados clínicos não alteraram durante as sete semanas seguintes e não ocorreu nenhuma reação adversa a MMC tópica, exceto hiperemia conjuntival média no fim do curso de tratamento. Com este estudo os autores concluíram que a administração tópica de MMC pode ser tratamento médico efetivo para melanose primária adquirida com atipia.

A opacificação capsular posterior é a complicação pós-operatória mais comum da cirurgia extracapsular de catarata. HAUS & GALAND (1996) empregaram solução contendo MMC durante a hidrodissecção (com pausa de 5 minutos) no processo de extração do cristalino por cirurgia extracapsular, em 26 olhos de 22 coelhos. Os autores escolheram esta via de administração para

reduzir a difusão da droga dentro da câmara anterior. Este estudo demonstrou que a MMC pode efetivamente inibir a opacificação capsular posterior depois da cirurgia de catarata em coelhos.

As causas mais freqüentes de insucesso da dacriocistorinostomia são obstrução dos canalículos comuns e fechamento da área da osteotomia por crescimento de tecido fibroso. KAO et al. (1997) utilizaram MMC como agente antiproliferativo, intraoperatório, aplicando algodão embebido em solução de MMC a 0,02 mg/ml, durante 30 minutos. A droga mostrou-se efetiva na manutenção da área da osteotomia, possibilitando aumento do sucesso da cirurgia tradicional.

O penfigóide ocular cicatricial é uma doença sistêmica, de etiologia presumivelmente autoimune. É caracterizada por reparação conjuntival, com fibrose sub-epitelial, simbléfaro, entrópio, triquíase, com conseqüentes danos à superfície da córnea. É considerada doença progressiva, crônica, caracterizada por períodos de remissão e exacerbação. A terapia médica convencional, para o penfigóide ocular cicatricial, é o emprego de imunossuppressores sistêmicos e corticosteróides, via oral, e em muitos casos, não é adequadamente controlada. DONNENFELD et al. (1999), trataram 9 pacientes com penfigóide ocular cicatricial, com injeções subconjuntivais de MMC 0,02%, na dose de 0,25ml, nas conjuntivas bulbar superior e inferior, no olho que apresentava em grau mais intenso a doença. O tratamento foi acompanhado num período médio de 23,5 meses (12 a 40 meses). Os autores verificaram que o uso da MMC foi efetivo na prevenção da progressão da cicatrização conjuntival. Observaram eritema e poucas complicações no uso da droga por via subconjuntival, quando comparada

com aplicação direta na esclera; provavelmente devido ocorrer preservação e integridade da superfície ocular.

A córnea e a conjuntiva são os tecidos oculares que apresentam maiores concentrações de medicações quando instiladas no olho, sendo as células epiteliais corneais mais susceptíveis aos efeitos citotóxicos cumulativos de drogas (BURSTEIN, 1980). Na presença de defeito epitelial da córnea, a MMC, colocada em contato direto com esta área, provoca retardo de sua reparação em relação a olhos controles e a outras drogas antimetabólicas (ALVES, 1995; ANDO et al., 1992; MATTAR et al., 1994; MATTAR, 1994). O filme lacrimal, parte importante na manutenção da turgescência da córnea e um dos principais elementos para boa acuidade visual, recobre a superfície ocular e está intimamente relacionado com o epitélio corneano, também sofre ação deletéria da MMC por diminuição do número de células caliciformes (DANJO et al., 1987 e HOLZCHUH et al., 1997).

O emprego da MMC em períodos mais longo do que 2 semanas ou em concentrações altas, como 0,1%, pode ser tóxica para a conjuntiva e córnea acarretando várias complicações como dor ocular, blefaroespasma, hiperemia da conjuntiva, erosão corneana e uveítes (FRUCHT-PERY & ROZENMAN, 1994; RUBINFELD et al., 1992; SINGH et al., 1988).

As informações referentes à dosagem de MMC e seu efeito adverso na córnea são limitadas, tornando necessárias investigações adicionais nesta área.

1.2. EPITÉLIO CORNEANO

O epitélio corneano é do tipo pavimentoso, estratificado, não ceratinizado e representa de 10 a 12% da espessura total da córnea humana (ARFFA, 1991; KLYCE & BEVERMAN, 1988). É constituído por cinco a seis camadas celulares no centro e por oito a dez na periferia (HOGAN et al., 1971; KENYON, 1979). Sob microscopia óptica, diferenciam-se três grupos de células: superficiais ou escamosas, intermediárias ou aladas e basais ou colunares.

O epitélio da córnea é mantido por um ciclo constante de desprendimento das células superficiais e pela proliferação das células na membrana basal. As células superficiais são as mais externas e diferenciadas. Elas estão em processo de degeneração, evidenciado pela falta de organelas e condensação de cromatina nuclear. Na microscopia eletrônica de varredura, a superfície da córnea tem arranjo irregular de células poligonais e as células estão cobertas por densa camada de microvilos aderentes como glicocálice (TSENG, 1989). Este glicocálice interage com a camada de mucina lacrimal para promover a formação de filme lacrimal estável e homogêneo na superfície da córnea. Apesar da porção mais externa estar se degenerando, ela constitui importante barreira entre a lágrima e as porções mais internas da córnea (POWER & NEVES, 1997).

As células intermediárias ou aladas formam 2 a 3 barreiras de células em estado intermediário de diferenciação. Apresentam citoplasma denso, superfície de convexidade anterior e núcleo achatado, num plano paralelo com a superfície

corneana. Numerosos desmossomos unem estas células entre si e às células basais (HOGAN et al., 1971; McDERMOTT, 1994).

As células basais constituem a camada germinativa do epitélio e contêm microfilamentos dispersos, ribossomas livres, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias, centríolos, um núcleo esférico com nucléolo e grânulos de glicogênio (DOHLMAN, 1971; HOGAN et al., 1971). As células basais são colunares e se unem umas às outras, lateralmente, por numerosos desmossomos (BINDER et al., 1980; HOGAN et al., 1971; SOONG & FAIRLEY, 1985). Filamentos de actina estão presentes ao longo das margens citoplasmáticas de suas membranas e são importantes para a migração celular que ocorre nos processos de regeneração epitelial. As células basais ligam-se à membrana basal através de hemidesmossomos e fibras de adesão.

A membrana basal do epitélio corneano, produto da secreção das células epiteliais basais, constitui o suporte para a organização do epitélio. Contribui, ainda, para a compartimentação das células e atua como moduladora de adesão, proliferação e diferenciação celular (McDERMOTT, 1994; TERVO et al., 1986).

O epitélio da córnea mantém sua população celular em equilíbrio dinâmico entre perda e renovação, tem capacidade de auto- renovação rápida. Ele possui um reservatório de células conhecidas como células matrizes germinativas, semelhante a outros órgãos que possuem esse tipo de equilíbrio (SANTO, 1999). Nas situações em que há necessidade de regeneração tecidual, as células germinativas, que estão localizadas na camada basal do epitélio límbico, entram em mitose, originando uma célula-filha, que permanece como célula germinativa,

garantindo a manutenção das mesmas, e outra destinada a dividir-se e diferenciar-se em célula epitelial da córnea (TSENG, 1989). Estas outras células são conhecidas como amplificadoras transitórias e, embora derivadas das germinativas, diferem destas pela sua maior atividade mitótica, tendo porém, um espectro de vida curta. A repopulação das células epiteliais ocorre através de uma migração celular centrípeta, ou seja, da periferia para centro da córnea, e vertical (BUCK, 1985; COTSARELIS et al., 1989; HUANG & TSENG, 1991; LAVKER et al., 1988; SCHERMER et al., 1986; THOFT & FRIEND, 1983; TSENG, 1989).

Quando o epitélio da córnea é lesado por trauma ou toxicidade medicamentosa, a reparação desenvolve-se rapidamente para restabelecer sua continuidade. O processo envolvido na regeneração do epitélio corneano pode ser dividido em três componentes distintos: migração, proliferação e adesão celular. Todos eles fazem parte de um processo contínuo, onde a contribuição de cada um varia, dependendo do tamanho, profundidade e natureza da lesão (DUA et al., 1994). Inicialmente as células na borda do defeito epitelial se retraem e perdem suas aderências hemidesmosômicas à membrana basal. As células aumentam e a capa epitelial começa a migrar, com movimentos amebóides, para cobrir o defeito (KLYCE & BEVERMAN, 1988; MILANI, 1992). Entre 24 e 48 horas ocorre um pico de proliferação epitelial para formar um tampão celular. Entre 6 e 14 dias, quando o tampão epitelial desaparece, o epitélio já apresenta espessura normal mas a adesão à membrana basal é fraca. Depois de 3 a 4 semanas, a aparência do epitélio é de normalidade, a camada basal está completa e o número

de hemidesmosomos aumenta até o 41º dia após o trauma. Novos hemidesmosomos são formados aderindo o epitélio à camada de células basais e estão localizados nas fibrilas de suporte da membrana basal. Quando não há lesão de membrana basal, a adesão do epitélio forma-se logo após a cicatrização. Modelos experimentais com lesão de membrana basal mostram a demora de até 12 meses para desenvolver os complexos de adesão normais (TSENG, 1989; ALVES & KARA-JOSÉ, 1997).

A deficiência das células germinativas pode originar doenças corneanas caracterizadas por dificuldade de epitelização, defeitos epiteliais persistentes, ou erosão recorrente. Essa deficiência pode ocorrer por agressão química, térmica, cirúrgica ou medicamentosa, envolvendo toda a superfície da córnea, estendendo-se para além do limbo, quando a sua regeneração fica comprometida (CHEN & TSENG, 1990). Para reparação destes defeitos, ocorre migração de epitélio conjuntival para a córnea, freqüentemente acompanhada de neovascularização, inflamação crônica e defeitos epiteliais persistentes ou recorrentes, levando à cicatrização do estroma. A disfunção das células germinativas do limbo é determinada pela presença de células caliciformes conjuntivais na superfície da córnea (ALVES & KARA-JOSÉ, 1997).

JABBUR et al. (1994) estudaram o efeito da MMC nas células germinativas do limbo, após realização de um defeito epitelial na córnea de coelhos e do uso tópico dessa droga. Concluíram que após 3 meses de uso da droga, era possível identificar interferência na proliferação destas células e no processo de

diferenciação do epitélio corneano. O efeito prolongado na diferenciação das células epiteliais corneanas poderia explicar algumas das graves complicações da MMC, desencadeadas no pós-operatório do pterígio, como defeitos epiteliais crônicos, ulcerações corneanas e esclerais e perfuração do globo ocular. As implicações clínicas destes achados e o significado deles, a longo prazo, ainda não foram esclarecidos.

1.3. Análise morfométrica e imuno-histoquímica

Os efeitos da instilação tópica de MMC a 0,02% e 0,04%, usada como tratamento quimioterápico em diversas patologias do globo ocular, ainda não são bem conhecidos na superfície ocular íntegra. A utilização dessa droga, nestas doses e em superfície ocular íntegra, pela análise histopatológica, através da morfometria e da imuno-histoquímica, permite avaliar sua influência no epitélio corneano.

Entende-se por morfometria o ato de medir estruturas anatômicas e, quando aplicada a nível celular fornece medidas do tamanho, número e forma da célula. Estas propriedades permitem análise quantitativa da hipertrofia ou atrofia celular, hiperplasia ou não da célula e manutenção da configuração celular (LOUD & ANVERSA, 1984).

A morfometria pode ser realizada através da contagem de pontos, de intersecções ou pelo uso de instrumentos semi ou totalmente automatizados. O método de contagem de pontos, devido à simplicidade e eficiência bem

estabelecidos, é preciso e rápido e utiliza-se de sistemas-teste com pontos a intervalos regulares. Cada ponto corresponde ao centro geométrico de um polígono, cuja área é conhecida (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995 e WEIBEL, 1963). Weibel (1963) comparando métodos de avaliação de áreas de uma mesma estrutura, concluiu que mantendo a precisão dos resultados em níveis estatisticamente significativos, a planimetria por contagem de pontos, como é chamada esta ciência, foi o método mais rápido.

Através da contagem de pontos, estima-se, nas regiões avaliadas, a área do epitélio corneano, as áreas do núcleo e citoplasma da célula epitelial, o número de núcleos, o número de núcleos redondos e a relação núcleo-citoplasma.

A imuno-histoquímica pode mostrar o padrão de diferenciação das células epiteliais corneanas, analisando-se o resultado da reação entre os anticorpos AE₁ e AE₅ com as citoceratinas do epitélio da córnea, das regiões límbica e central. As citoceratinas são filamentos intermediários que constituem o citoesqueleto de quase todas as células epiteliais e têm importante papel na proliferação, diferenciação e interações celulares (FRANKE et al., 1981). As citoceratinas são expressas em pares, compostos por uma citoceratina básica e outra ácida. Os epitélios conjuntival, límbico e corneano mostram heterogeneidade na expressão das citoceratinas (SANTO, 1999). As células basais do limbo, em condições normais, consideradas como células germinativas ou células primordiais, na reação imuno-histoquímica coram com o anticorpo AE₁, mas não coram com o anticorpo AE₅. O epitélio maduro da córnea reage com o anticorpo AE₅ e não

apresenta reação com o anticorpo AE₁ (KIRITOSHI et al., 1991; SANTO et al., 1994; SCHERMER et al., 1986).

KIRITOSHI et al. (1991) estudaram a diferenciação de células epiteliais da córnea e limbo, pela avaliação imuno-histoquímica das expressões das citoceratinas reconhecidas por anticorpos monoclonais: AE₁ e AE₅. As células epiteliais humanas, depois de 1 a 2 semanas em cultura, não reagem com AE₅ mas exercem forte reação com AE₁. Depois de 3 semanas, somente as células suprabasais mostraram uma reatividade moderada com AE₅, considerando que a ligação de AE₁ foi observada em todas as células. Depois de 5 a 6 semanas de cultura, todas as células reagiram moderadamente com AE₅ e AE₁. Semelhante às células epiteliais humanas, as células epiteliais suprabasais de coelhos expressam reatividade com AE₅ somente após 10 dias em cultura

Com a popularização do uso tópico de MMC no tratamento de diversas afecções da superfície ocular, impõe-se avaliar o potencial iatrogênico de dano da droga nas células germinativas límbicas corneanas e no seu processo de diferenciação celular.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste experimento foram de avaliar os efeitos desencadeados pelo uso da mitomicina C e água destilada, na superfície córneo-conjuntival íntegra de coelhos, sob o ponto de vista clínico, morfométrico e imuno-histoquímico.

MATERIAL E MÉTODOS

3. - MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental desta pesquisa foi realizada na Disciplina de Anestesiologia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As análises laboratoriais deste estudo foram realizadas no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Laboratório de Investigação Médica (L.I.M. – 33) da Disciplina de Oftalmologia da Universidade de São Paulo e Laboratório de Pesquisas Experimentais e Patologia Clínica da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

3.1. MATERIAL

3.1.1. ANIMAIS

Utilizaram-se 28 coelhos machos, raça Califórnia, espécie *Oryctolagus cuniculi*, com idade ao redor de 4 meses (média de 3,75 meses \pm 0,53), provenientes da cunicultura da fazenda de Pirassununga, pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Todos os animais se encontravam em perfeito estado de saúde, livres de ecto e endoparasitas.

Os procedimentos aos quais os animais se submeteram foram aprovados previamente através do protocolo de pesquisa em reunião do Conselho de Ética da Faculdade de Medicina da USP e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. Os coelhos foram tratados de acordo com as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais - COBEA (<http://www.meusite.com.br/etica.htm>) e da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia "A.R.V.O." (NIH 1985).

3.1.2. SOLUÇÕES UTILIZADAS

- Colírio de mitomicina C na concentração de 0,02%
- Colírio de fluoresceína sódica na concentração de 2%
- Colírio anestésico de tetracaína a 1%
- Solução de cloreto de sódio a 0,9%
- Água destilada
- Álcool etílico

Preparo das Soluções

A) Mitomicina C:

O colírio de mitomicina C possuía as seguintes características químicas:

- concentração = 0,02%
- pH = 6,8
- osmolaridade = 8,0mOsm/l

Foi preparado na concentração de 0,02%, que corresponde a 0,2mg do pó liofilizado do Mitocin* diluído em 1ml de água destilada.

O pH foi determinado na Farmácia do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com pH meter E 520 da Metrohm Herisau.

A osmolaridade foi determinada no Laboratório Fleury de Análises Clínicas de São Paulo, com osmômetro da Advanced Instruments Inc..

B) Fluoresceína sódica:

O colírio de fluoresceína foi preparado na concentração de 2%, ou seja, 20 mg do pó de fluoresceína sódica** em 1ml de água destilada e foi utilizado para complementação das avaliações biomicroscópicas feitas na lâmpada de fenda.

* Laboratório Bristol – São Paulo.

** Laboratório E. Merck, Darmstadt – Alemanha.

C) Colírio anestésico:

O colírio anestésico* contém em sua composição cloridrato de tetracaína 10mg/ml, cloridrato de fenilefrina 1mg/ml, ácido bórico 15mg/ml.

C) Cloreto de Sódio:

A solução de cloreto de sódio a 0,9%** , na forma de colírio, foi instilada nos olhos dos animais, para remoção do excesso de fluoresceína, nas avaliações biomicroscópicas em lâmpada de fenda.

D) Água Destilada:

Foi empregada na forma de colírio e instilada nos olhos controle.

E) Álcool Etílico

Foi utilizado para auxiliar na remoção do epitélio da córnea, preparado a 95%, a partir do álcool a 99,99%, diluído em água destilada.

Obs. Os colírios de mitomicina C e fluoresceína sódica e as soluções utilizadas foram manipulados e fornecidos por farmacêutico***.

As medicações foram mantidas sob refrigeração, à 4° C e ao abrigo da luz.

* Laboratório Allergan-Look Produtos Farmacêuticos Ltda.

** Darrow Laboratório S.A.

*** Farmácia Ophthalmos

3.1.3. DROGAS UTILIZADAS PARA ANESTESIA

- Cloridrato de xilazina*, dose de 0,1 ml/kg, por via intramuscular.
- Solução de pentobarbital sódico a 3%** , dose de 25 mg/kg, por via intravenosa, na veia marginal da orelha.

3.1.4. EXAME HISTOPATOLÓGICO

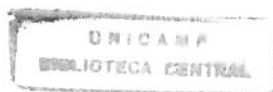
O material extraído foi incluso em parafina, no formato de blocos, para estudo morfométrico e imuno-histoquímico. A confecção destes blocos de parafina e a análise morfométrica foram realizadas no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1.5. EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO

Os blocos para avaliação imuno-histoquímica foram encaminhados para o Laboratório de Pesquisas Experimentais e Patologia Clínica da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, onde foram manufaturadas as lâminas e a análise das mesmas.

* Rompun = Laboratório Bayer S.A. - Saúde Animal

** Hypnol = Lab. Fontoveter, Divisão Veterinária de Cristália Prod. Químicos Farmacêuticos Ltda.



Os anticorpos utilizados para essa análise foram:

AE₁^{*}: reage com as citoceratinas ácidas, as de nº 19, 16 e 14 que expressam epitélio em proliferação.

AE₅^{}**: reage especificamente com a citoceratina básica de 64 Kilodaltons, marcador de diferenciação do epitélio corneal, expressa no epitélio maduro.

Preparo dos anticorpos:

AE₁ = 1:100 diluído com PBS pH = 7,4

AE₅ = 1:50 diluído com PBS pH = 7,2

^{*} Progen Biotechnik GMBH – Heidelberg - Alemanha

^{**} ICN Biomedicals, INC Costa Mesa, Califórnia, USA

3.2. MÉTODOS

3.2.1. LOTES DE ANIMAIS

Após serem examinados na lâmpada de fenda para afastar anormalidades das superfícies córneo - conjuntival e palpebral de ambos os olhos, os coelhos foram aleatoriamente divididos em 4 lotes (lotes A e B com 6 animais, C e D com 8 animais).

Os animais foram pesados, média de $2.751,07\text{g} \pm 423,10\text{g}$ (ANEXO 1), em seguida colocados em gaiolas individuais marcadas por letra correspondente ao lote a que pertenciam. As orelhas direitas foram numeradas de 1 a 28, com caneta hidrográfica para sua identificação.

3.2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.2.2.1. ADMINISTRAÇÃO DE COLÍRIOS

Os olhos direitos dos animais do lote A, B, C e D foram medicados com água destilada (olhos controle), 2 gotas, 4 vezes ao dia, durante 14 dias.

Nos olhos esquerdos dos animais do lote A instilou-se água destilada e nos lotes B, C e D colírio de mitomicina C a 0,02% (olhos tratados), na dosagem de 2 gotas, 4 vezes ao dia, por 14 dias.

Antes da instilação da droga, as pálpebras dos coelhos eram levantadas de forma que toda solução colocada permanecia dentro da bolsa formada, depois eram movimentadas para maior distribuição e absorção, minimizando-se assim a perda da substância instilada.

3.2.2.2. EXAMES CLÍNICOS DE CONTROLE

Os animais foram submetidos à exame ocular realizado em lâmpada de fenda, diariamente, antes e após a instilação de colírio de fluoresceína sódica a 2%, durante os 14 dias de instilação da mitomicina C e água destilada. Foram examinadas as margens das pálpebras, conjuntiva e córnea, para avaliação de possíveis efeitos tóxicos da droga. A presença de hiperemia conjuntival e/ou de reação bléfaro-conjuntival, foram avaliadas semi-quantitativamente, estabelecendo-se o seguinte escore: (ANEXO 2)

- ausência
- + intensidade leve
- ++ intensidade moderada
- +++ intensidade máxima

A avaliação da presença de alteração do epitélio, bem como sua integridade, foi feita anotando-se as dimensões, número e formas de ulcerações

quando presentes. Também foram avaliadas possíveis alterações estromais e processos de neovascularização.

3.2.2.3. COLHEITA DE MATERIAL

Imediatamente após os exames de controle realizados no 15^o dia (animais do lote B), no 50^o dia (animais do lote C) e no 100^o dia (animais do lote D), os coelhos foram tranqüilizados com cloridrato de xilazina na dose de 0,1 ml/kg de peso vivo, por via intra muscular. A veia marginal da orelha foi canulada com um Butterfly 25G* e mantida com solução de cloreto de sódio a 0,9%, para administração do agente anestésico. A anestesia foi realizada com solução de pentobarbital sódico a 3%, na dose de 25 mg/kg de peso vivo, até a completa extração da córnea do globo ocular. Em seguida, os animais foram sacrificados, aprofundando o plano anestésico com a solução descrita acima.

As córneas foram retiradas, através de uma incisão na esclera, com penetração na câmara anterior, no setor temporal, a 2 mm do limbo, utilizando-se bisturi lâmina 11. Com tesoura, completou-se a extirpação da córnea, incluindo o limbo. Um fio de sutura, de seda preto 4 "0", foi previamente passado no limbo às 12:00 horas, como ponto de referência.

As córneas foram divididas ao meio, no sentido das 12:00 às 6:00 horas. Metade das córneas foram transferidas para frascos individuais contendo formol tamponado a 10% e, a outra metade com álcool etílico a 95% para estudo imuno-

* Becton, Dickinson Indústrias Cirúrgicas S.A.

histoquímico. Todos os frascos foram identificados para posterior inclusão em parafina.

3.2.2.4. REMOÇÃO DE ÁREA CENTRAL DO EPITÉLIO DA CÓRNEA

Foram selecionados, aleatoriamente por sorteio, 2 animais do lote C e 2 do lote D para serem submetidos à remoção de área central do epitélio da córnea. Os do lote C foram submetidos à realização do defeito epitelial no 46º dia e os do lote D no 96º dia.

Estes animais foram anestesiados com o mesmo protocolo descrito anteriormente. Em seguida, instilou-se uma gota de colírio de tetracaína a 0,5% em ambos os olhos. Após irrigação da superfície ocular com solução de cloreto de sódio a 0,9%, demarcou-se com trépano*, não cortante, de 8,0mm de diâmetro no centro da córnea, a área de epitélio a ser removida. Com o mesmo em posição introduziu-se uma zaragatoa saturada em álcool etílico a 95%, por dentro do trépano, tocando o epitélio por 30 segundos.

Foi realizada a remoção do epitélio na área demarcada, com bisturi lâmina 15, após irrigação com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%.

Comprovou-se a retirada do epitélio da área central da córnea, uniforme, superficial e de limites nítidos, instilando-se fluoresceína sódica a 2%; seu excesso

* Storz Instrument Company = nº 3096

foi removido com cloreto de sódio a 0,9% e o animal examinado na lâmpada de fenda.

Após 4 dias da realização do defeito, os coelhos foram sacrificados e suas córneas, de ambos os olhos, estudadas.

3.2.3. ANÁLISES LABORATORIAIS

Os exames foram executados sem conhecimento prévio do quadro clínico e de que lote de animais provinha o material do estudo.

3.2.3.1. PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO

As córneas que foram conservadas em formol tamponado à 10% e encaminhadas para exame histopatológico, obedeceram às técnicas histoquímicas utilizadas de rotina, na Divisão de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que são:

- Desidratação em soluções de álcool com concentrações crescentes de 70% até absoluto;
- Clareamento (diafanização) com solução de xilol;
- Inclusão em parafina;
- Secção com micrótomo em cortes de 5 micra;

- Reidratação em soluções de álcool com concentrações decrescentes de absoluto até 70%;
- Coloração pelo método de hematoxilina-eosina;
- Montagem com lâmina e lamínula em bálsamo do Canadá.

Depois de preparadas as lâminas, foram encaminhadas para análise morfométrica.

3.2.3.2. PROCESSAMENTO IMUNO-HISTOQUÍMICO

As córneas dos olhos esquerdos, conservadas em álcool etílico a 95%, foram encaminhadas à Divisão de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e, seguindo a técnica anteriormente descrita, até o momento da inclusão em parafina, foram confeccionados os blocos.

Estes blocos foram enviados para o Laboratório de Pesquisas Experimentais e Patologia Clínica da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, onde foram confeccionadas as lâminas e feita avaliação imuno-histoquímica.

O material acima preparado foi submetido a reação dos anticorpos **AE₁** e **AE₅** com as citoceratinas do epitélio da córnea e reveladas pelo método ABC (complexo redutor-estreptovidina e biotina peroxidase revelada).

A técnica utilizada para confecção das lâminas foi baseada no protocolo de reação de imunoperoxidase, que consta de duas etapas:

1ª Etapa:

- Imersão rápida das lâminas em xilol I para desparafinar (antes do uso, o xilol I teve de ser colocado na estufa à 110°C, por \pm 30 minutos),
- Imersão em xilol II e III (temperatura ambiente),
- Passagem em álcool absoluto I, II e III, 80% e 50%,
- Lavagens em água corrente e destilada,
- Bloqueio da peroxidase endógena:

H ₂ O ₂ (30%)	10 ml
-------------------------------------	-------

Metanol	90 ml
---------	-------

incubação por 15 minutos na solução a 30% (temperatura ambiente),

- Lavagens em água corrente e destilada,
- Processo de digestão enzimática (tripsina):
 - para lâminas de **AE₁**, duração de 8 minutos, a 37°C
 - para lâminas de **AE₅**, são colocadas no microondas, 2 vezes de 7 minutos cada, espera de 15 minutos para esfriar
- Lavagem em água destilada e colocação em tampão PBS (solução tampão de fosfato) de pH=7,6,

- Instilação dos anticorpos primários específicos e incubação em estufa a 37°C, por 30 minutos,
- Colocação na geladeira à 4°C toda noite.

2ª Etapa:

- Retirada das lâminas da incubação com anticorpo primário e fazer 3 lavagens (no agitador) em PBS, com duração de 5 minutos cada, à temperatura ambiente,
- Secagem com papel de filtro e instilação do anticorpo secundário Multi-Link; incubação na estufa a 37° C, por 1 hora,
- Lavagens em 3 etapas (no agitador) com PBS, de 5 minutos cada,
- Secagem com papel de filtro e instilação do complexo ABC; incubação em estufa a 37°C, por 40 minutos,
- Colocação das lâminas no tampão PBS e coloração com DAB (diaminobenzedina), por 5 minutos (controle da coloração com microscópio),
- Lavagens em água corrente e destilada,
- Contracoloração com hematoxilina de Mayer, por \pm 45 segundos,
- Lavagens com água corrente e destilada,
- Passagem por alguns segundos em água amoniacal,

- Lavagens com água corrente e destilada,
- Passagens por álcoois I, II e III (desidratar) e xilóis I, II e III,
- Montagem em bálsamo do Canadá.

3.2.3.3. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Nas lâminas coradas por hematoxilina-eosina, no epitélio da córnea foram observados os seguintes parâmetros:

- continuidade da camada de células epiteliais com o estroma adjacente;
- atipia celular (hipercromasia e/ou polimorfismo nuclear) denotando alterações inflamatórias ou regenerativas.

3.2.3.4. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Para o estudo morfométrico do epitélio da córnea, empregou-se o método de contagens de pontos, que utiliza um sistema-teste com pontos fixos e sistematicamente equidistantes ao acaso sobre uma estrutura. (ANEXO 3) O número **p** de pontos incidentes em um determinado perfil seccional forneceu uma estimativa direta e não viciada de sua área **a** (GUNDERSEN e JENSEN, 1987). Esta estimativa **[a]** é convenientemente expressa em termos de distância **u** entre dois pontos adjacentes ao sistema-teste, através da seguinte fórmula:

$$[a] = p \cdot u^2$$

A obtenção do valor do coeficiente de erro (**CE**) na estimativa de áreas [**a**] por contagem de pontos foi calculado pela fórmula:

$$\text{CE} = \text{SE} / \text{M}$$

onde, **SE** = erro padrão e **M** = média.

As estimativas de erro calculadas foram sempre inferiores a 5%.

A análise morfométrica foi feita nas lâminas coradas com hematoxilina-eosina, utilizando-se um microscópio óptico* (Micro Star, American Optical) com sistema-teste constituído por 100 pontos e 50 segmentos de reta, adaptado a uma das oculares. A metodologia utilizada para obtenção dos dados foi a contagem de pontos preconizada por WEIBEL, em 1963.

Sob microscopia óptica, em aumento de 400X, foram contados o número de campos não coincidentes do epitélio da córnea pelo retículo do sistema-teste, no sentido das 12:00 às 6:00 horas. Essas medidas permitiram padronizar o local para avaliação do epitélio da córnea. Dez campos foram avaliados na região central e límbica do epitélio, respectivamente. Na região do limbo avaliou-se cinco em cada uma das periferias da córnea, consideradas a partir do desaparecimento de células caliciformes conjuntivais.

Uma vez identificada a área de estudo, a leitura de cada campo foi feita com aumento de 1000X. A contagem do número de pontos coincidentes do

* Micro Star, American Optical

retículo sistema-teste permitiu avaliar na região límbica e central do epitélio da córnea, os seguintes parâmetros:

- área estimada do epitélio,
- número de núcleos,
- número de núcleos redondos,
- relação núcleo-citoplasma,
- área da célula do epitélio,
- área do núcleo da célula do epitélio,
- área do citoplasma da célula do epitélio.

3.2.3.5. ANÁLISE DO PADRÃO DE DIFERENCIAÇÃO DO EPITÉLIO CORNEANO

IMUNO-HISTOQUÍMICA

A análise do padrão de diferenciação das células epiteliais das regiões límbica e central da córnea foi feita com o emprego dos seguintes anticorpos: **AE₁** e **AE₅**. O método da avidina-biotina-peroxidase foi utilizado para verificar a reação imuno-histoquímica. (ANEXO 4)

- As células do epitélio da córnea maduro reagem com **AE₅** e não com **AE₁**.
- As células supra basais do epitélio do limbo reagem com **AE₁** e **AE₅**.
- As células basais do limbo reagem com **AE₁** e não com **AE₅**.

Foram confeccionadas 4 lâminas, de cada córnea, para **AE₁** e para **AE₅**.

3.2.4. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados numérico - estatísticos foram apresentados através de médias aritméticas, desvios-padrão, medianas e valores mínimos e máximos.

Neste estudo, como os dados não possuíam distribuição gaussiana, utilizou-se testes não paramétricos:

- **Prova de Kruskal-Wallis (H)** – para comparação entre mais de 2 tratamentos, envolvendo diferentes lotes de animais.

- **Prova de comparação múltipla de Scheffé** – para comparações múltiplas entre diferentes tratamentos, envolvendo diferentes lotes de animais.

Em todos os testes estatísticos utilizou-se a medida descritiva **p** e adotou-se o nível crítico de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

4 - RESULTADOS

4.1. Análise Biomicroscópica

Não foram observadas blefarites, blefaro-conjuntivites, conjuntivites ou ceratites nos animais medicados com água destilada ou mitomicina C. Hiperemia conjuntival foi verificada a partir do 4º dia nos olhos tratados com mitomicina C. A hiperemia tornou-se mais intensa em alguns animais do que em outros, intensificando-se na 2ª semana de uso da droga, desaparecendo com a suspensão. (ANEXO 2)

4.2. Análise histopatológica

No estudo histopatológico dos olhos controle e dos olhos medicados com mitomicina C, observou-se córnea com células epiteliais ordenadamente dispostas, com as camadas obedecendo à maturação normal; ou seja, continuidade normal da camada epitelial, ausência de edema e de infiltrado inflamatório.

4.3. Análise morfométrica do epitélio corneano

Pela análise morfométrica, pode-se ter uma estimativa da área do epitélio, do nº de núcleos, do nº de núcleos redondos, da relação núcleo - citoplasma, da

área da célula epitelial e da área do núcleo e do citoplasma da célula epitelial, avaliados na região límbica e central da córnea. (ANEXO 3)

4.3.1. Área estimada do epitélio na região do limbo e central da córnea

Nos olhos tratados com MMC a 0,02%, observou-se aumento significativo da área estimada do epitélio, na região do limbo e central, no 15º e 50º dia de avaliação em relação aos valores do grupo controle ($p < 0,0001$). (Tabela 1 e 2; Gráfico 1 e 2)

4.3.2. Número estimado de núcleos na região do limbo e central da córnea

Nos olhos medicados com MMC a 0,02%, observou-se diminuição significativa do número estimado de núcleos, nas regiões do limbo e central da córnea, nas avaliações feitas no 15º dia ($p < 0,0001$), em relação aos outros grupos analisados. (Tabela 3 e 4; Gráfico 3 e 4)

4.3.3. Número estimado de núcleos redondos, na região do limbo e central da córnea

Nos olhos tratados com MMC a 0,02%, observou-se diminuição significativa do número estimado de núcleos redondos, na região do limbo da córnea, nas

avaliações feitas no 15º e 50º dias, em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). (Tabela 5 e Gráfico 5)

Nas avaliações feitas no 100º dia, a estimativa do número de núcleos redondos, nas regiões do limbo e central da córnea, mostraram um aumento significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). (Tabela 5 e 6; Gráfico 5 e 6)

4.3.4. Valor estimado da relação núcleo-citoplasma, na região do limbo e central da córnea

Nos olhos tratados com MMC a 0,02%, observou-se diminuição significativa no valor estimado da relação núcleo-citoplasma das células do epitélio, na região do limbo, nos animais avaliados no 15º e 50º dia, em relação aos valores dos grupos controle e de 100 dias ($p < 0,0001$). (Tabela 7 e Gráfico 7)

Na região central da córnea, houve aumento significativo no valor estimado da relação núcleo-citoplasma das células do epitélio, nos animais avaliados no 100º dia em relação aos valores do grupo controle, 15 º e 50º dias ($p = 0,0004$). (Tabela 8 e Gráfico 8)

4.3.5. Área estimada da célula epitelial, na região do limbo e central da córnea

Nos olhos tratados com MMC a 0,02%, observou-se que, tanto na porção límbica como na central da córnea, aumento significativo na área estimada da célula epitelial, nas avaliações do 15º e 50º dias, em relação aos valores do grupo controle e dos 100 dias ($p < 0,0001$). (Tabelas 9 e 10; Gráficos 9 e 10)

4.3.6. Área estimada do núcleo da célula epitelial na região do limbo e central da córnea

Nos olhos tratados com MMC a 0,02%, verificou-se pela análise estatística, que na área estimada do núcleo da célula epitelial, na região do limbo, não houve diferença significativa entre os animais dos grupos controle, 15, 50 e 100 dias de avaliação ($p > 0,7180$). (Tabela 11 e Gráfico 11)

A área estimada do núcleo da célula epitelial, na região central da córnea, apresentou aumento significativo nas avaliações feitas no 15º dia, em relação as avaliações realizadas no 100º dia ($p < 0,0045$). (Tabela 12 e Gráfico 12)

4.3.7. Área estimada do citoplasma da célula epitelial, na região do limbo e central da córnea

Nos olhos medicados com MMC a 0,02%, observou-se aumento significativo da área do citoplasma da célula epitelial, na região do limbo e central

da córnea, nas avaliações realizadas no 15º e 50º dia, em relação aos valores controle e de 100 dias ($P < 0,0001$). (Tabelas 13 e 14; Gráficos 13 e 14)

4.4. Análise imuno-histoquímica

Na análise do padrão de diferenciação das células epiteliais da região límbica e central da córnea, verificou-se que todas as células do limbo reagiram com o anticorpo AE₁ em todos os lotes avaliados. Também observou-se que todas as células do epitélio da córnea reagiram com o anticorpo AE₅ em todos os animais dos lotes estudados. (Quadro 1)

4.5. Avaliação dos animais submetidos a remoção da área central do epitélio da córnea

A análise imuno-histoquímica das células epiteliais, da região límbica e central da córnea, dos animais submetidos a remoção da área central do epitélio, não evidenciou alteração no padrão de diferenciação celular. (Quadro 1)

Tabela 1: - Valores das médias, desvios-padrão (D.P.), medianas, variações mínimas e máximas e número dos campos estudados dos olhos (Nº) das estimativas da área do epitélio (μm^2), na região do limbo, nos animais dos grupos controle (CC) e mitomicina C (0,02%) observada nos intervalos de 15, 50 e 100 dias (MMC 15d, MMC 50d e MMC 100d). Comparação feita pela Prova de Kruskal-Wallis (H).

Grupo	Média \pm D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	Nº
CC	2288,00 \pm 655,00	2200,00	1000,00	4100,00	60
MMC 15d	2883,00 \pm 1386,00	2900,50	0,00	7600,00	60
MMC 50d	2587,00 \pm 581,00	2500,00	1600,00	4000,00	60
MMC 100d	2118,00 \pm 1407,00	1950,00	1000,00	8000,00	60

H = 43,55

P < 0,0001*

Com o emprego do teste de comparações múltiplas de Scheffé, foram identificadas as seguintes diferenças entre os grupos avaliados:

(MMC 100d = CC) \neq (MMC 50d = MMC 15d)

Tabela 2: - Valores das médias, desvios-padrão (D.P.), medianas, variações mínimas e máximas e número dos campos estudados dos olhos (Nº) das estimativas da área do epitélio (μm^2), na região central, nos animais dos grupos controle (CC) e mitomicina C (0,02%) observada nos intervalos de 15, 50 e 100 dias (MMC 15d, MMC 50d e MMC 100d). Comparação feita pela Prova de Kruskal-Wallis (H).

Grupo	Média \pm D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	Nº
CC	2432,00 \pm 735,00	2050,00	1400,00	4200,00	60
MMC 15d	3288,00 \pm 809,00	3200,00	1900,00	5400,00	60
MMC 50d	2973,00 \pm 874,00	2750,00	1800,00	6500,00	60
MMC 100d	2015,00 \pm 852,00	1900,00	0,00	4100,00	60

H = 73,14

P < 0,0001*

Com o emprego do teste de comparações múltiplas de Scheffé, foram identificadas as seguintes diferenças entre os grupos avaliados:

$$(MMC\ 100d = CC) \neq (MMC\ 50d = MMC\ 15d)$$

Tabela 3: - Valores das médias, desvios-padrão (D.P.), medianas, variações mínimas e máximas e número dos campos estudados dos olhos (Nº) da estimativa do número de núcleos, na região do limbo, nos animais dos grupos controle (CC) e mitomicina C (0,02%) observada nos intervalos de 15, 50 e 100 dias (MMC 15d, MMC 50d e MMC 100d). Comparação feita pela Prova de Kruskal-Wallis (H).

Grupo	Média \pm D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	Nº
CC	33,13 \pm 8,27	32,50	20,00	52,00	60
MMC 15d	21,05 \pm 9,65	21,00	0,00	47,00	60
MMC 50d	28,88 \pm 5,95	29,00	13,00	44,00	60
MMC 100d	31,65 \pm 7,37	31,00	18,00	52,000	60

H = 56,57

P < 0,0001*

Com o emprego do teste de comparações múltiplas de Scheffé, foram identificadas as seguintes diferenças entre os grupos avaliados:

MMC 15d \neq (MMC 50d = MMC 100d = CC)

Tabela 4: - Valores das médias, desvios-padrão (D.P.), medianas, variações mínimas e máximas e número dos campos estudados dos olhos (Nº) da estimativa do número de núcleos, da região central, nos animais dos grupos controle (CC) e mitomicina C (0,02%) observada nos intervalos de 15, 50 e 100 dias (MMC 15d, MMC 50d e MMC 100d). Comparação feita pela Prova de Kruskal-Wallis (H).

Grupo	Média \pm D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	Nº
CC	29,75 \pm 4,52	30,00	21,00	38,00	60
MMC 15d	23,95 \pm 4,67	24,00	15,00	33,00	60
MMC 50d	27,67 \pm 5,17	27,00	20,00	51,00	60
MMC 100d	26,87 \pm 6,78	27,00	0,00	38,00	60

H = 38,64

P < 0,0001*

Com o emprego do teste de comparações múltiplas de Scheffé, foram identificadas as seguintes diferenças entre os grupos avaliados:

MMC 15d \neq (MMC 100d = MMC 50d = CC)

Tabela 5 - Valores das médias, desvios-padrão (D.P.), medianas, variações mínimas e máximas e número dos campos estudados dos olhos (Nº) das estimativas do número de núcleos redondos, na área epitelial, da região do limbo, nos animais dos grupos controle (CC) e mitomicina C (0,02%) observada nos intervalos de 15, 50 e 100 dias (MMC 15d, MMC 50d e MMC 100d). Comparação feita pela Prova de Kruskal-Wallis (H).

Grupo	Média \pm D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	Nº
CC	9,82 \pm 8,07	6,50	0,00	35,00	60
MMC 15d	4,55 \pm 2,99	4,00	0,00	15,00	60
MMC 50d	4,77 \pm 2,98	4,00	0,00	14,00	60
MMC 100d	14,80 \pm 8,85	14,00	1,00	46,00	60

H = 74,50

P < 0,0001*

Com o emprego do teste de comparações múltiplas de Scheffé, foram identificadas as seguintes diferenças entre os grupos avaliados:

$$(MMC\ 15d = MMC\ 50d) \neq CC \neq MMC\ 100d$$

Tabela 6 - Valores das médias, desvios-padrão (D.P.), medianas, variações mínimas e máximas e número dos campos estudados dos olhos (Nº) das estimativas do número de núcleos redondos, na área epitelial, da região central, nos animais dos grupos controle (CC) e mitomicina C (0,02%) observada nos intervalos de 15, 50 e 100 dias (MMC 15d, MMC 50d e MMC 100d). Comparação feita pela Prova de Kruskal-Wallis (H).

Grupo	Média ± D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	Nº
CC	6,78 ± 5,39	4,00	0,00	23,00	60
MMC 15d	3,75 ± 1,88	4,00	0,00	9,00	60
MMC 50d	4,42 ± 2,47	4,00	1,00	16,00	60
MMC 100d	12,45 ± 6,03	12,50	0,00	27,00	60

H = 76,19

P < 0,0001*

Com o emprego do teste de comparações múltiplas de Scheffé, foram identificadas as seguintes diferenças entre os grupos avaliados:

(MMC 15d = MMC 50d = CC) ≠ MMC 100d

Tabela 7: - Valores das médias, desvios-padrão (D.P.), medianas, variações mínimas e máximas e número dos campos estudados dos olhos (Nº) da estimativa da relação núcleo-citoplasma das células do epitélio, na região do limbo, nos animais dos grupos controle (CC) e mitomicina C (0,02%) observada nos intervalos de 15, 50 e 100 dias (MMC 15d, MMC 50d e MMC 100d). Comparação feita pela Prova de Kruskal-Wallis (H).

Grupo	Média \pm D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	Nº
CC	0,41 \pm 0,14	0,40	0,10	0,90	60
MMC 15d	0,29 \pm 0,14	0,30	0,00	0,60	60
MMC 50d	0,33 \pm 0,11	0,32	0,11	0,59	60
MMC 100d	0,48 \pm 0,14	0,49	0,18	0,82	60

H = 56,25

P < 0,0001*

Com o emprego do teste de comparações múltiplas de Scheffé, foram identificadas as seguintes diferenças entre os grupos avaliados:

(MMC 15d = MMC 50d) \neq (CC = MMC 100d)

Tabela 8: - Valores das médias, desvios-padrão (D.P.), medianas, variações mínimas e máximas e número dos campos estudados dos olhos (Nº) da estimativa da relação núcleo-citoplasma das células do epitélio, na região central, nos animais dos grupos controle (CC) e mitomicina C (0,02%) observada nos intervalos de 15, 50 e 100 dias (MMC 15d, MMC 50d e MMC 100d). Comparação feita pela Prova de Kruskal-Wallis (H).

Grupo	Média \pm D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	Nº
CC	0,33 \pm 0,10	0,31	0,15	0,57	60
MMC 15d	0,28 \pm 0,09	0,27	0,10	0,50	60
MMC 50d	0,30 \pm 0,08	0,31	0,14	0,48	60
MMC 100d	0,36 \pm 0,15	0,36	0,00	0,67	60

H = 18,09

P = 0,0004*

Com o emprego do teste de comparações múltiplas de Scheffé, foram identificadas as seguintes diferenças entre os grupos avaliados:

$$(MMC\ 15d = MMC\ 50d = CC) \neq MMC\ 100d$$

Tabela 9: - Valores das médias, desvios-padrão (D.P.), medianas, variações mínimas e máximas e número dos campos estudados dos olhos (Nº) das estimativas da área da célula epitelial (μm^2), na região do limbo, nos animais dos grupos controle (CC) e mitomicina C (0,02%) observada nos intervalos de 15, 50 e 100 dias (MMC 15d, MMC 50d e MMC 100d). Comparação feita pela Prova de Kruskal-Wallis (H).

Grupo	Média \pm D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	Nº
CC	21,37 \pm 6,11	20,00	9,00	38,00	60
MMC 15d	26,90 \pm 13,40	28,00	0,00	72,00	60
MMC 50d	24,15 \pm 6,09	23,00	13,00	40,00	60
MMC 100d	19,68 \pm 13,62	17,00	8,00	79,00	60

H = 38,17

P < 0,0001*

Com o emprego do teste de comparações múltiplas de Scheffé, foram identificadas as seguintes diferenças entre os grupos avaliados:

(MMC 100d = CC) \neq (MMC 50d = MMC 15d)

Tabela 10: - Valores das médias, desvios-padrão (D.P.), medianas, variações mínimas e máximas e número dos campos estudados dos olhos (Nº) das estimativas da área da célula epitelial (μm^2), na região central, nos animais dos grupos controle (CC) e mitomicina C (0,02%) observada nos intervalos de 15, 50 e 100 dias (MMC 15d, MMC 50d e MMC 100d). Comparação feita pela Prova de Kruskal-Wallis (H).

Grupo	Média \pm D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	Nº
CC	22,45 \pm 7,26	19,00	12,00	40,00	60
MMC 15d	32,27 \pm 8,72	31,50	18,00	57,00	60
MMC 50d	27,43 \pm 7,98	25,00	18,00	65,00	60
MMC 100d	19,08 \pm 8,66	18,00	0,00	41,00	60

H = 72,80

P < 0,0001*

Com o emprego do teste de comparações múltiplas de Scheffé, foram identificadas as seguintes diferenças entre os grupos avaliados:

(MMC 100d = CC) \neq (MMC 50d = MMC 15d)

Tabela 11: - Valores das médias, desvios-padrão (D.P.), medianas, variações mínimas e máximas e número dos campos estudados dos olhos (Nº) das estimativas da área do núcleo da célula epitelial (μm^2), na região do limbo, nos animais dos grupos controle (CC) e mitomicina C (0,02%) observada nos intervalos de 15, 50 e 100 dias (MMC 15d, MMC 50d e MMC 100d). Comparação feita pela Prova de Kruskal-Wallis (H).

Grupo	Média \pm D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	Nº
CC	8,48 \pm 3,01	8,50	3,00	17,00	60
MMC 15d	8,02 \pm 3,86	8,50	0,00	19,00	60
MMC 50d	7,92 \pm 2,78	8,00	2,00	14,00	60
MMC 100d	9,15 \pm 6,15	8,00	2,00	32,00	60

H = 1,35

P = 0,7180

Tabela 12: - Valores das médias, desvios-padrão (D.P.), medianas, variações mínimas e máximas e número dos campos estudados dos olhos (Nº) das estimativas da área do núcleo da célula epiteliais (μm^2), da região central, nos animais dos grupos controle (CC) e mitomicina C (0,02%) observada nos intervalos de 15, 50 e 100 dias (MMC 15d, MMC 50d e MMC 100d). Comparação feita pela Prova de Kruskal-Wallis (H).

Grupo	Média \pm D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	Nº
CC	7,35 \pm 3,10	7,00	3,00	19,00	60
MMC 15d	8,73 \pm 3,14	9,00	3,00	16,00	60
MMC 50d	8,03 \pm 3,14	7,00	4,00	23,00	60
MMC 100d	6,93 \pm 3,69	6,00	0,00	17,00	60

H = 13,04

P = 0,0045*

Com o emprego do teste de comparações múltiplas de Scheffé, foram identificadas as seguintes diferenças entre os grupos avaliados:

MMC 100d \neq MMC 15d

Tabela 13: - Valores das médias, desvios-padrão (D.P.), medianas, variações mínimas e máximas e número dos campos estudados dos olhos (Nº) das estimativas da área do citoplasma da célula do epitélio (μm^2), na região do limbo, nos animais dos grupos controle (CC) e mitomicina C (0,02%) observada nos intervalos de 15, 50 e 100 dias (MMC 15d, MMC 50d e MMC 100d). Comparação feita pela Prova de Kruskal-Wallis (H).

Grupo	Média \pm D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	Nº
CC	12,88 \pm 5,18	13,00	1,00	27,00	60
MMC 15d	18,88 \pm 11,04	19,00	0,00	54,00	60
MMC 50d	16,23 \pm 5,36	15,50	7,00	30,00	60
MMC 100d	10,60 \pm 8,22	9,00	2,00	47,00	60

H = 48,84

P < 0,0001*

Com o emprego do teste de comparações múltiplas de Scheffé, foram identificadas as seguintes diferenças entre os grupos avaliados:

$$(MMC\ 100d = CC) \neq (MMC\ 50d = MMC\ 15d)$$

Tabela 14: - Valores das médias, desvios-padrão (D.P.), medianas, variações mínimas e máximas e número dos campos estudados dos olhos (Nº) das estimativas da área do citoplasma da célula do epitélio (μm^2), na região central, nos animais dos grupos controle (CC) e mitomicina C (0,02%) observada nos intervalos de 15, 50 e 100 dias (MMC 15d, MMC 50d e MMC 100d). Comparação feita pela Prova de Kruskal-Wallis (H).

Grupo	Média \pm D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	Nº
CC	15,10 \pm 5,31	14,00	6,00	28,00	60
MMC 15d	23,53 \pm 7,53	22,50	11,00	46,00	60
MMC 50d	19,40 \pm 6,30	18,00	12,00	42,00	60
MMC 100d	12,15 \pm 6,66	10,00	0,00	28,00	60

H = 77,34

P < 0,0001*

Com o emprego do teste de comparações múltiplas de Scheffé, foram identificadas as seguintes diferenças entre os grupos avaliados:

(MMC 100d = CC) \neq (MMC 50d = MMC 15d)

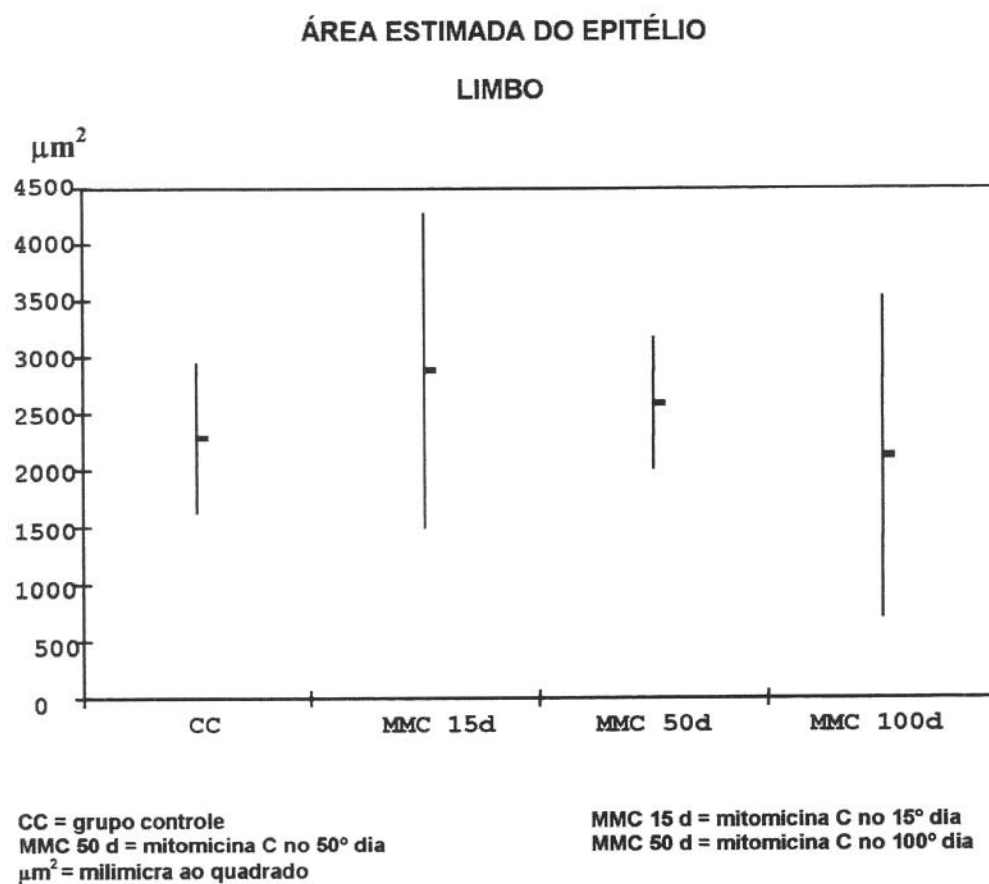


Gráfico 1: - Representação gráfica dos valores estimados da média e desvio-padrão da área do epitélio da córnea, na região do limbo.

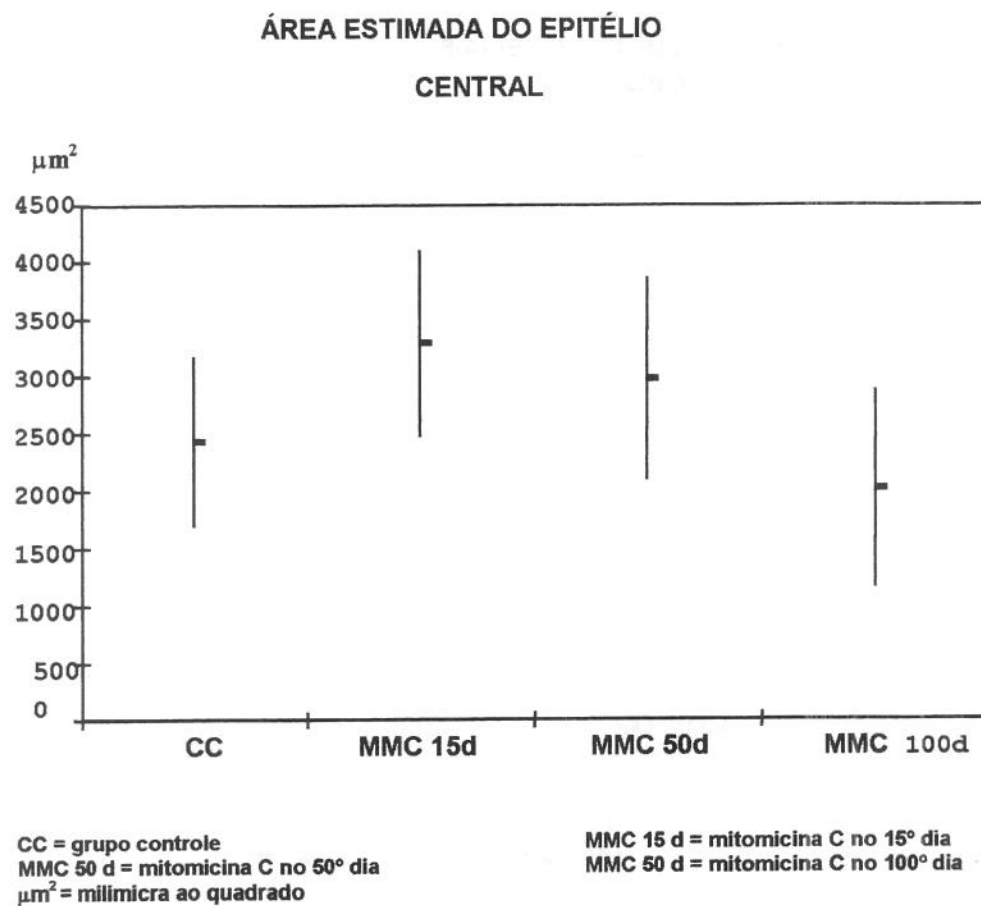


Gráfico 2: - Representação gráfica dos valores estimados da média e desvio-padrão da área do epitélio da córnea, na região central.

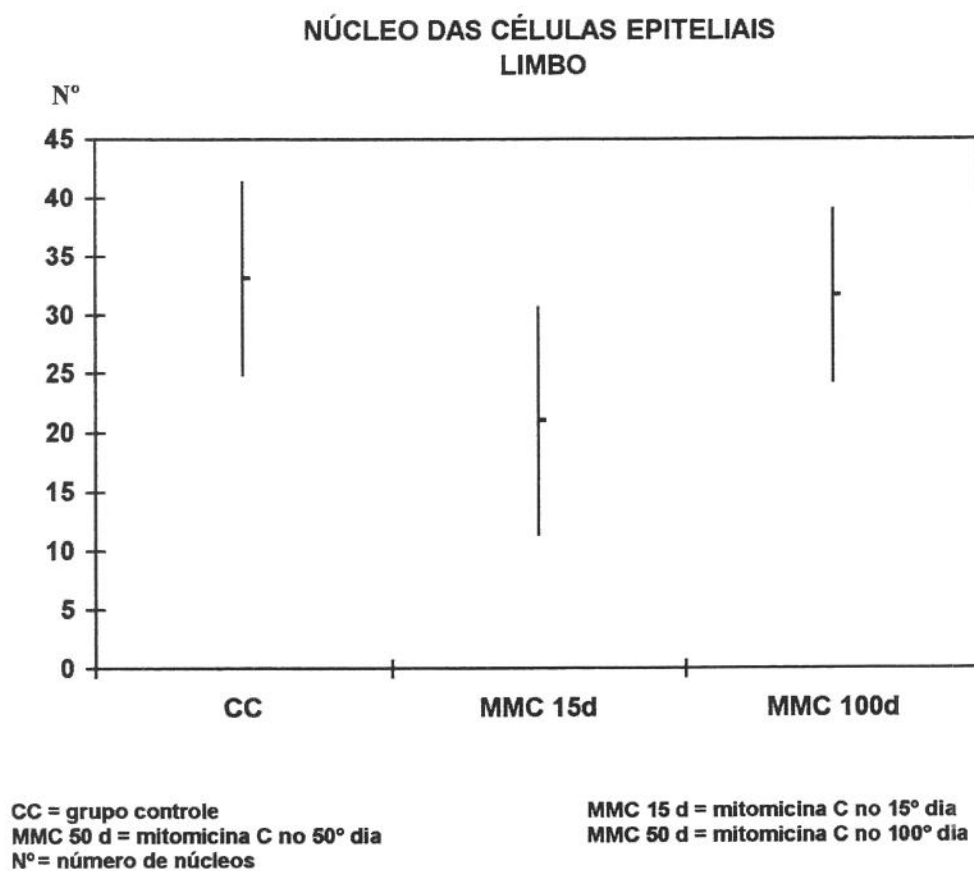


Gráfico 3: - Representação gráfica dos valores estimados da média e desvio-padrão do número de núcleos do epitélio da córnea, na região do limbo.

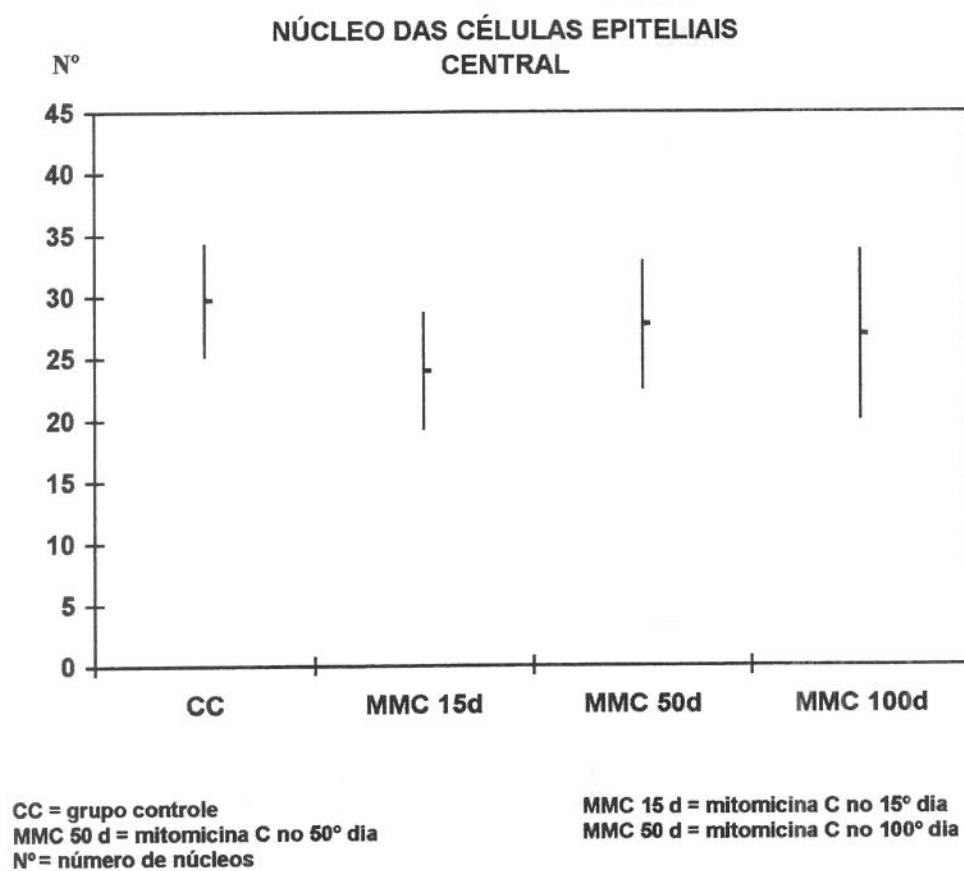


Gráfico 4: - Representação gráfica dos valores estimados da média e desvio-padrão do número de núcleos do epitélio da córnea, na região central.

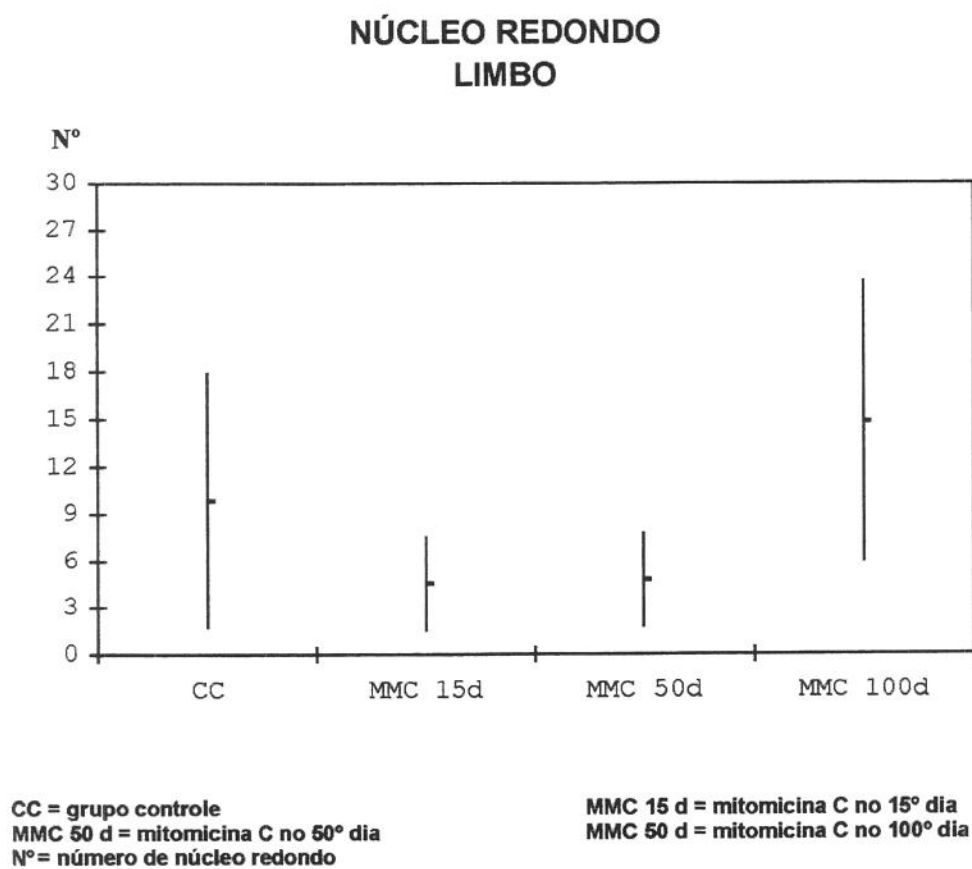
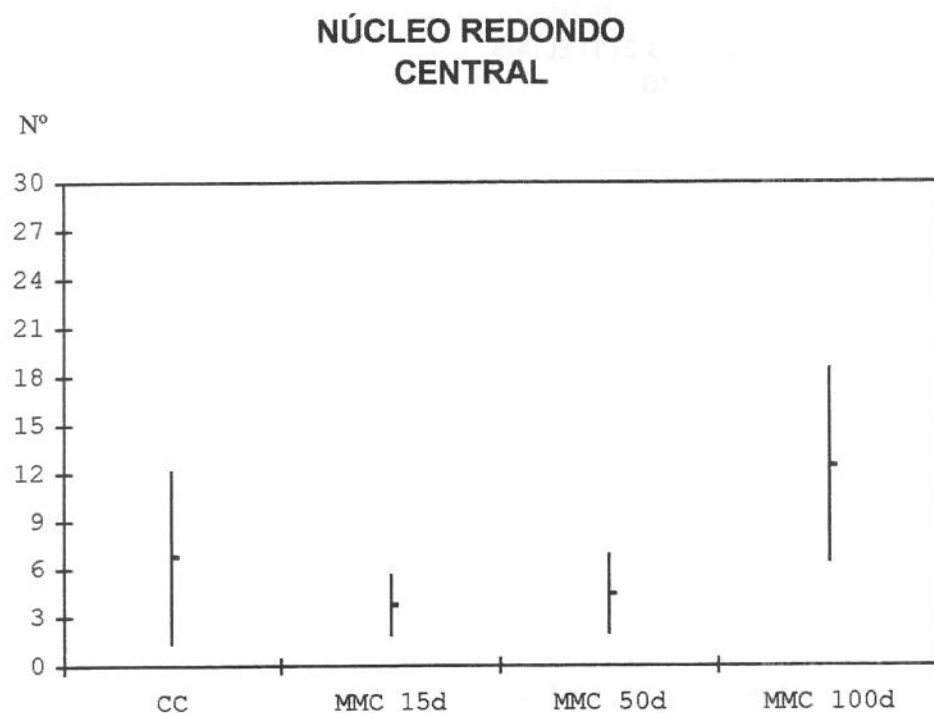


Gráfico 5 - Representação gráfica dos valores estimados da média e desvio-padrão do número de núcleos redondos no epitélio da córnea, na região do limbo



CC = grupo controle
MMC 50 d = mitomicina C no 50º dia
Nº = número de núcleo redondo

MMC 15 d = mitomicina C no 15º dia
MMC 50 d = mitomicina C no 100º dia

Gráfico 6 - Representação gráfica dos valores estimados da média e desvio-padrão do número de núcleos redondos no epitélio da córnea, na região central.

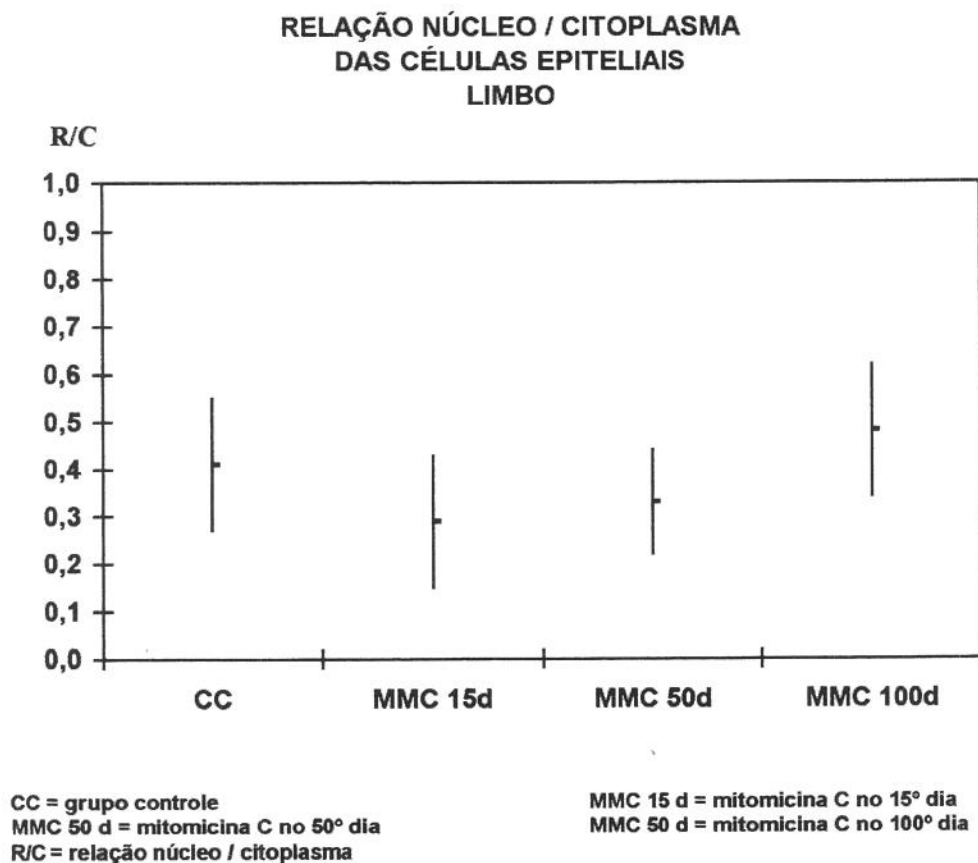


Gráfico 7: - Representação gráfica dos valores estimados da média e desvio-padrão da relação núcleo-citoplasma das células do epitélio da córnea, na região do limbo.

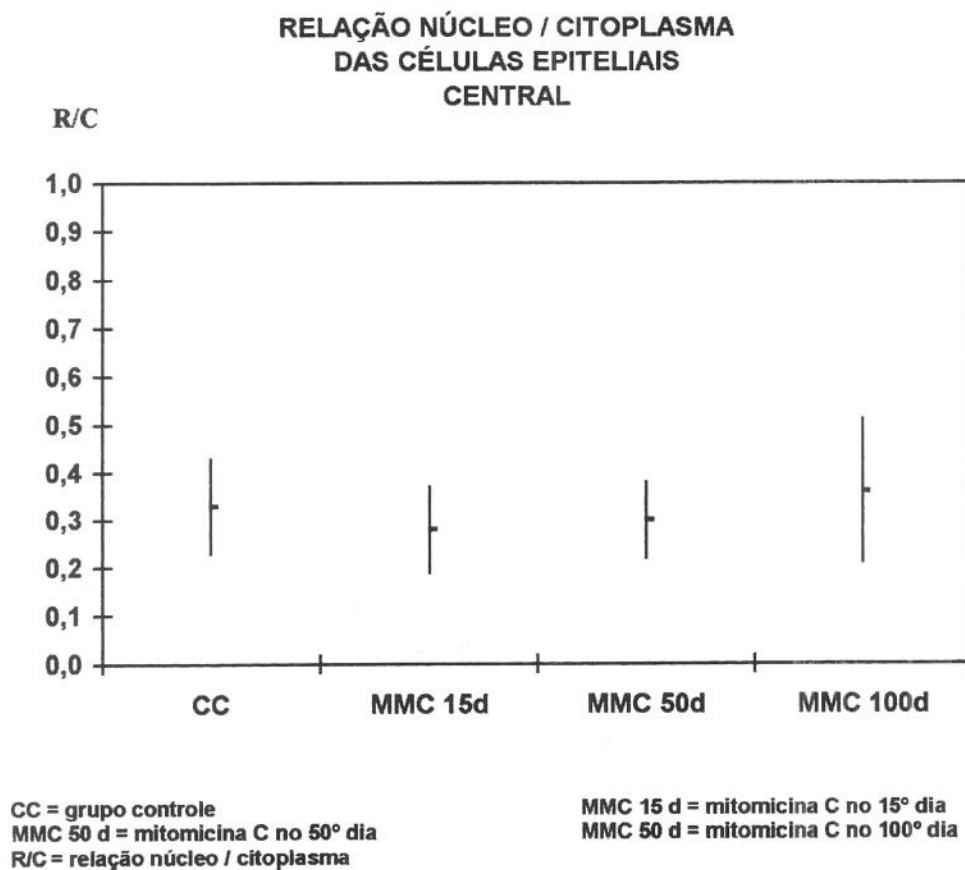


Gráfico 8: - Representação gráfica dos valores estimados da média e desvio-padrão da relação núcleo-citoplasma das células do epitélio da córnea, na região central.

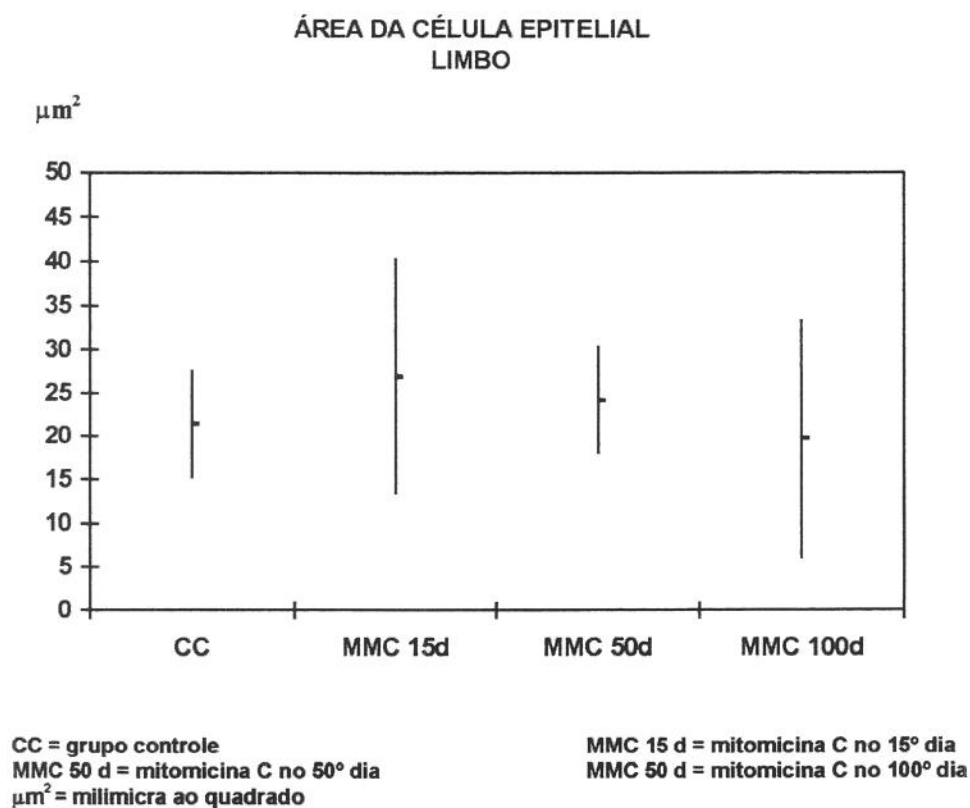
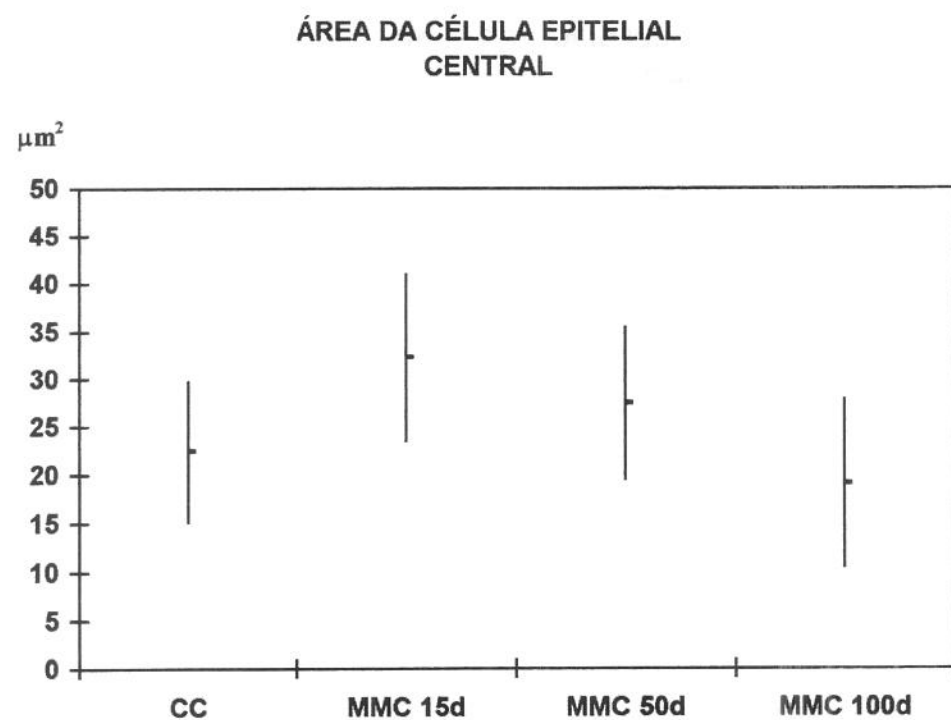


Gráfico 9: - Representação gráfica dos valores estimados da média e desvio-padrão da área das células do epitélio da córnea (µm²), apurados na região do limbo.



CC = grupo controle

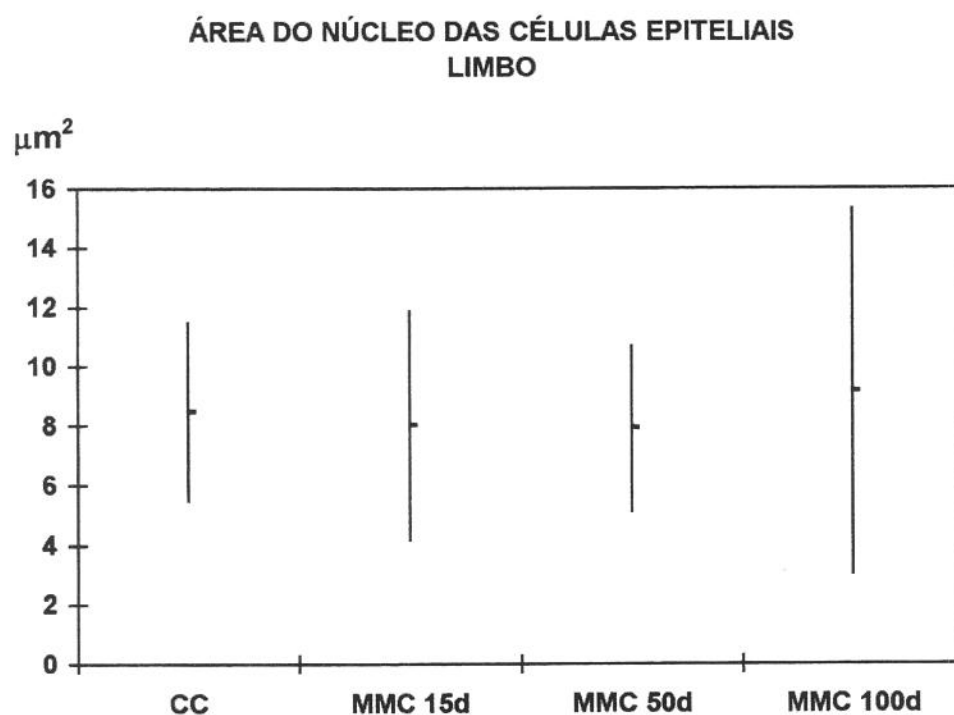
MMC 50 d = mitomicina C no 50º dia

μm^2 = milimicra ao quadrado

MMC 15 d = mitomicina C no 15º dia

MMC 50 d = mitomicina C no 100º dia

Gráfico 10: - Representação gráfica dos valores estimados da média e desvio-padrão da área das células do epitélio da córnea (μm^2), apurados na região central.



CC = grupo controle
 MMC 50 d = mitomicina C no 50º dia
 μm^2 = milimicra ao quadrado

MMC 15 d = mitomicina C no 15º dia
 MMC 100 d = mitomicina C no 100º dia

Gráfico 11: - Representação gráfica dos valores estimados da média e desvio-padrão da área do núcleo das células do epitélio da córnea, na região do limbo.

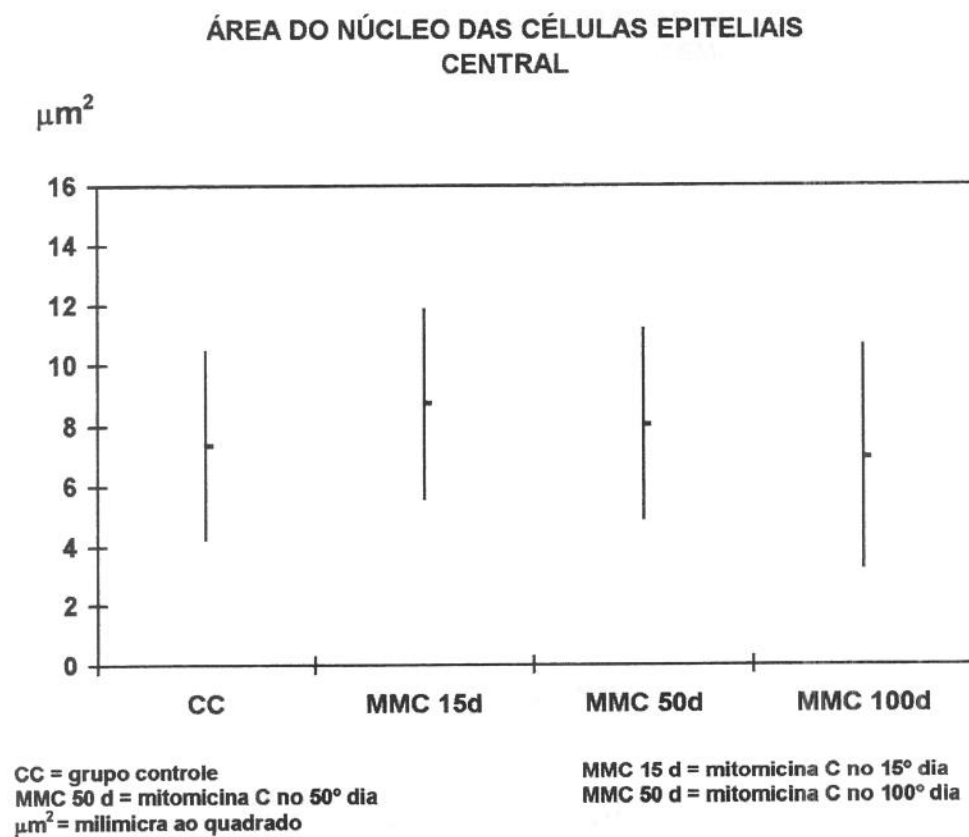


Gráfico 12: - Representação gráfica dos valores estimados da média e desvio-padrão da área do núcleo das células do epitélio da córnea, na região central.

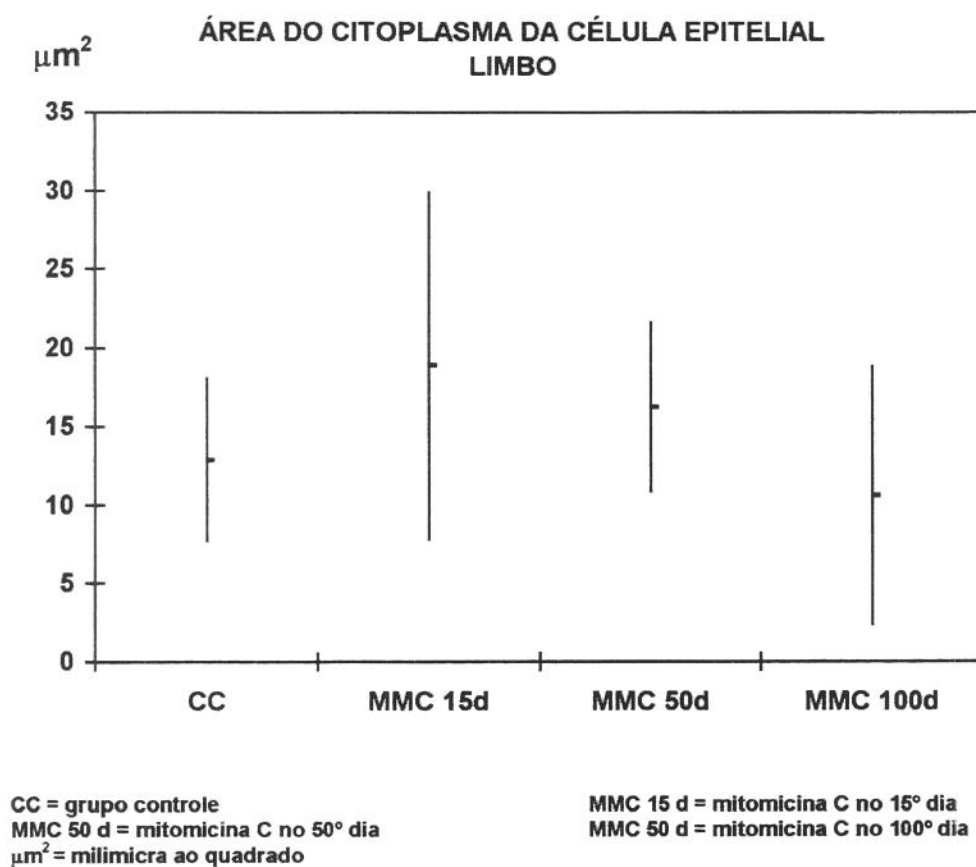


Gráfico 13: - Representação gráfica dos valores estimados da média e desvio-padrão da área do citoplasma das células epiteliais da córnea (μm^2), na região do limbo.

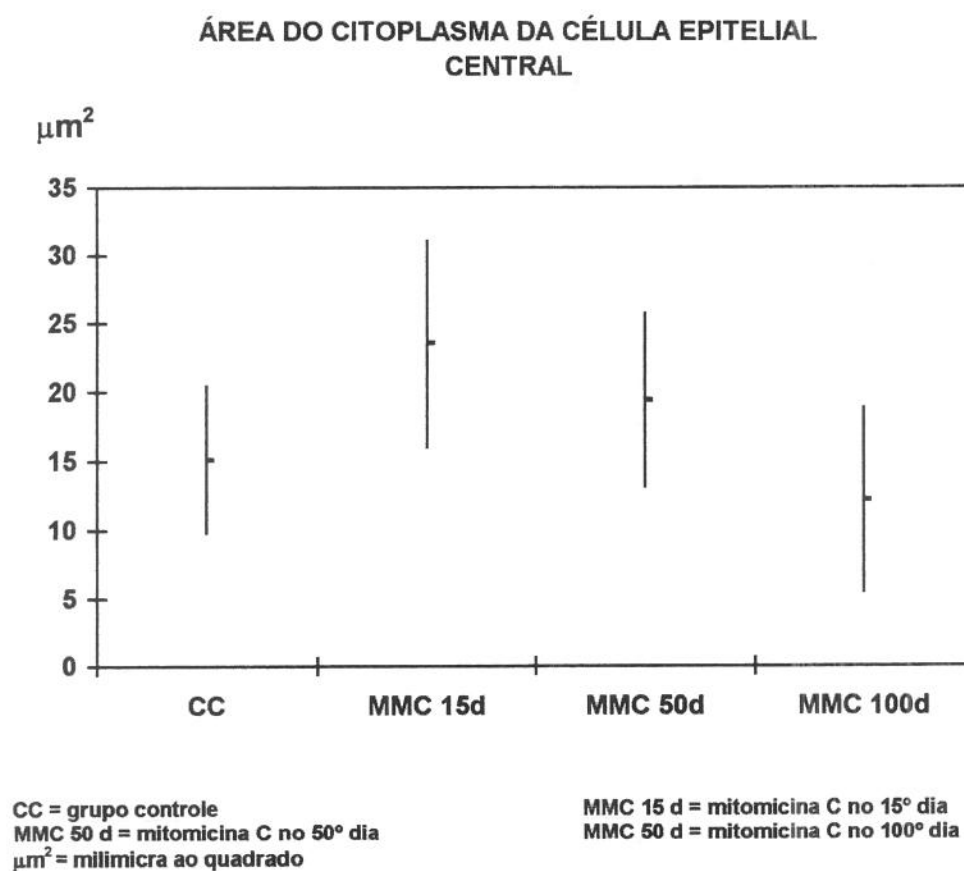


Gráfico 14: - Representação gráfica dos valores estimados da média e desvio-padrão da área do citoplasma das células epiteliais da córnea (μm^2), na região central.

QUADRO 1: Resultados obtidos da reação imuno-histoquímica, da expressão das citoceratinas das células epiteliais corneanas de coelhos, com os anticorpos AE1 e AE5, observados nos grupos controle (CC) e tratados com Mitomicina C a 0,02%, avaliados no 15º, 50º e 100º dia.

DIAS	ANIMAL Nº	AE ₁				AE ₅			
		OD		OE		OD		OE	
		L (+)	C (-)	L (+)	C (-)	L (-)	C (+)	L (-)	C (+)
CC	15	+	-	+	-	-	+	-	+
	17	+	-	+	-	-	+	-	-----
	18	+	-	+	-	-	+	-	+
	19	+	-	+	-	-	+	-	+
	21	+	-	+	-	-	+	-	+
	22	+	-	+	-	-	+	-	-----
15	4	+	-	+	-	-	+	-	+
	7	+	-	+	-	++	+	-	+
	11	+	-	+	-	-	+	++	+
	12	-----	-	+	-	++	+	-	+
	23	+	-	-----	-	-	+	-	-----
	24	+	-	-	-	-	+	-	+
50	3	+	-	+	-	-	+	-	+
	8	+	-	+	-	-	+	-	+
	9	+	-	+	-	-	+	-	+
	13	+	-	+	-	-	+	-	+
	25	+	-	+	-	-	+	-	+
	26	+	-	+	-	-	+	-	+
100	1	+	-	+	-	-	+	-	+
	5	+	-	+	-	-	+	-	+
	10	+	-	+	-	++	+	-	+
	14	+	-	+	-	++	+	-	+
	27	+	-	+	-	-	+	-	+
	28	+	-	+	-	-	+	-	+
DEFEITO EPITELIAL									
DIAS	ANIMAL Nº	OD		OE		OD		OE	
		L (+)	C (-)	L (+)	C (-)	L (-)	C (+)	L (-)	C (+)
50	6	-----	-	+	-----	-	+	-	-----
	16	+	-	+	-----	-	-----	-	+
100	2	+	-	+	-	-	+	-	+
	20	+	-	+	-	-	+	-	+

AE1 = ANTICORPO AE1
 OD = OLHO DIREITO
 L = LIMBO
 ----- = NÃO CONCLUSIVO

AE5 = ANTICORPO AE5
 OE = OLHO ESQUERDO
 C = CÔRNEA

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O coelho foi escolhido para delineamento experimental devido ao fato de ser dócil para manuseio, exames, administração de drogas e fácil de ser mantido confinado em gaiolas individuais (MILLER et al., 1989). A córnea do coelho tem um raio de curvatura estimado em 7,3mm com eixo horizontal mais longo, criando uma forma elíptica, sendo que a média desses valores é de 15mm na horizontal e 13mm na vertical, semelhante à córnea humana, sendo adequado para pesquisas oftalmológicas (POWER & NEVES, 1997; BISTNER et al., 1977). O coelho é muito utilizado nos experimentos que estudam os efeitos do trauma e influência de drogas sobre a atividade de reparação do epitélio corneano (HIRST et al., 1981). Provavelmente isso ocorra porque como relataram BISTNER et al. (1977), quando se remove o epitélio da córnea de coelhos, a sua espessura aumenta cerca de 200% em 24 horas e, se além disso, o endotélio for danificado, este aumento pode chegar a 500%.

A partir de relatos da literatura, enfatizando que estudos experimentais feitos com diferentes concentrações de MMC e 5-fluorouracil, colocadas por 5 a 15 minutos na superfície ocular íntegra de coelhos, não provocaram alterações epiteliais detectáveis por avaliações biomicroscópicas (ANDO et al., 1992) e, que a administração de baixas concentrações de MMC não afetaram a função básica do epitélio corneano normal (FRUCHT-PERY & ROZENMAN, 1994; FRUCHT-PERY et al., 1997; SAMPAIO, 1992), resolveu-se investigar os efeitos da MMC a

0,02%, instilada 2 gotas, 4 vezes ao dia, durante 14 dias, na superfície íntegra do epitélio da córnea de coelhos.

Nos primeiros dias de instilação do colírio de MMC a 0,02%, não se notou qualquer alteração clínica macroscópica e nem biomicroscópica no olho esquerdo dos animais dos lotes B,C e D. A partir do 4º dia foi observada presença de hiperemia conjuntival, nos olhos tratados com MMC a 0,02%, que aumentou nos dias subseqüentes, persistindo até o 21º dia, ou seja, uma semana após o término da instilação do colírio. A hiperemia variou de leve a moderada em todos os animais não chegando a comprometer seu comportamento. Nos olhos medicados com água destilada (ambos os olhos dos animais do lote A e no olho direito dos lotes B,C e D), não foi observada nenhuma reação clínica ou qualquer alteração ao exame na lâmpada de fenda.

Estes dados concordam com os estudos de FRUCHT-PERY & ROSENMAN, (1994), FRUCHT-PERY et al. (1997) e HOLZCHUH et al. (1997), que observaram presença de discreta hiperemia conjuntival durante a instilação de MMC a 0,02%, desaparecendo após suspensão da droga.

Não foram observadas blefarite, bléfaró-conjuntivite, conjuntivite ou ceratite, em nenhum período do experimento. SAMPAIO et al. (1995), utilizaram colírio de MMC nas concentrações de 0,02%, 0,04%, 0,08% e 0,16%, em olhos de ratas, na dosagem de 1 gota, 4 vezes ao dia, por 14 dias, observaram reação bléfaró-conjuntival moderada e ceratite puntiforme difusa somente nos olhos em que utilizaram as 2 maiores concentrações, ao longo da segunda semana de uso da droga, com regressão 5 dias após a suspensão da medicação. Concluíram que

estas alterações eram relacionadas à dose. MATTAR et al. (1995), administraram MMC nas concentrações de 0,04% e 0,02%, na dosagem de 2 gotas, 2 vezes ao dia, por 5 dias, também não detectaram blefarites, bléfaró-conjuntivites, conjuntivites ou ceratites nas coelhas medicadas. Assim, os resultados obtidos neste experimento, com MMC a 0,02%, mostram coerência com os relatados na literatura.

No estudo histopatológico das córneas obtidas dos olhos controle e dos olhos medicados com MMC, não foram identificadas alterações do epitélio corneano. As córneas examinadas apresentavam-se com células epiteliais ordenadamente dispostas, as camadas obedecendo à maturação normal, sem solução de continuidade. Ausência de edema e infiltrado inflamatório.

O epitélio límbico apresenta a mais alta taxa mitótica do epitélio corneano (EBATO et al., 1987; EBATO et al., 1988). Muitos dos mais potentes agentes citotóxicos atuam em fases específicas do ciclo celular e, portanto, têm atividade apenas contra células que estão em processo de divisão (CALABRESI & PARKS Jr., 1987). Como a MMC provavelmente induz maior dano às células com intensa atividade proliferativa, a droga atuaria especificamente nos processos de síntese do DNA e funcionamento do fuso mitótico das células germinativas presentes no limbo corneano. Ainda não estão estabelecidas as doses mínimas eficazes da droga nos diversos usos oftalmológicos e nem as concentrações que podem causar lesões irreversíveis, principalmente nestas células com maior capacidade proliferativa. ANDO et al. (1992) relataram que os resultados observados *in vivo* indicam que a MMC inibe a proliferação das células epiteliais da córnea e este

efeito inibitório é dependente da dose utilizada, sendo que os limites da dose variam de 0,0016% a 0,2% e a DL50 foi estimada ser 0,06%. A confirmação destas informações seguramente contribuiria para diminuir o número de complicações relacionadas a droga.

Objetivando verificar possíveis alterações no epitélio da córnea, realizou-se análise morfométrica, que tem capacidade de fornecer a estimativa da medida de estruturas anatômicas. Um valor morfométrico individual isolado tem pouco significado e é difícil de ser interpretado (LOUD & ANVERSA, 1984). Normalmente, as determinações morfométricas são feitas numa dada amostra de estruturas de indivíduos diferentes e obtêm-se um resultado que deve representar estatisticamente a média das medidas feitas (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995). Nesta pesquisa houve preocupação de se analisar, por morfometria, diferentes áreas do epitélio e, em todas, foi feito um levantamento com amostragem correspondente a 60 campos avaliados por estrutura, para se poder estabelecer uma média estatisticamente representativa, com coeficiente de erro sempre inferior à 5% e um resultado mais preciso do estudo histopatológico.

Verificou-se que o uso tópico da MMC determinou alterações morfométricas significativas em diferentes estruturas do epitélio corneano, nas regiões do limbo e central (Tabelas 1 a 14, Gráficos 1 a 14).

Nos olhos medicados com MMC em relação aos controles, observou-se aumento da área estimada do epitélio corneano límbico e central nas avaliações realizadas aos 15 e 50 dias. (Tabelas 1 e 2; Gráficos 1 e 2). Esse aumento da área estimada do epitélio corneano límbico e central deveu-se a hipertrofia da

célula epitelial por aumento do citoplasma, uma vez que houve diminuição do número de núcleos. (Tabelas 3 e 4, Gráficos 3 e 4) COTRAN et al. (1994a) relataram que a hipertrofia celular por edema ocorre quando as células são incapazes de manter a homeostase fluída e iônica. Constitui alteração reversível e sua morfologia é difícil de ser apreciada com microscópio de luz. Sua presença determina aumento de volume do órgão. Já nos processos reparativos, o aumento do tamanho das células não se deve muito ao edema celular, por ser consequência da síntese de mais componentes estruturais (COTRAN et al., 1994b).

A diminuição do número de núcleos e de núcleos redondos, da célula epitelial, (Tabelas 3, 4, 5 e 6; Gráficos 3, 4, 5 e 6) ocorreram pelo efeito antiproliferativo da MMC, que tem atividade contra todas as células, independentemente da fase do ciclo celular, sendo mais intensa na fase final de pré-síntese (G_1) e no início da síntese do DNA (S) (CROOKE & BRADNER, 1976; JAMPEL, 1992).

Evidenciou-se redução significativa do valor da relação núcleo-citoplasma das células epiteliais, nas avaliações realizadas no 15º e 50º dia, na região límbica (Tabela 7 e Gráfico 7), enquanto houve aumento significativo na região central, nas avaliações realizadas no 100º dia. (Tabela 8 e Gráfico 8) Essas alterações provavelmente são consequências da droga inibir a síntese de DNA e RNA, degradar o DNA pré-formado e causar lise do núcleo celular (CROOKE & BRADNER, 1976).

A área estimada da célula epitelial e do citoplasma da célula do epitélio corneano, na região do limbo e central, apresentaram aumento no 15º e 50º dia. (Tabelas 9, 10, 13 e 14; Gráficos 9, 10, 13 e 14) Alves (1995) estudou os efeitos da MMC em diferentes concentrações, 0,008%, 0,02% e 0,04%, e constatou, pela morfometria, aumento da área do citoplasma, tanto na região do limbo como central da córnea. Em relação à área da célula epitelial, verificou diminuição na concentração de 0,02%. Isto ocorreu provavelmente devido ao curto espaço do emprego da MMC, 2 gotas, a cada 12 horas, por 4 dias, enquanto nesta pesquisa, foi instilada 2 gotas, 4 vezes ao dia, por 14 dias.

As alterações morfométricas significativas que ocorreram nas regiões límbica e central do epitélio da córnea, na maioria dos parâmetros, voltaram a níveis do controle, na avaliação de 100 dias. (Tabelas 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13 e 14; Gráficos 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13 e 14)

Os achados deste estudo evidenciaram presença de alterações morfométricas nas diferentes estruturas analisadas no epitélio da córnea por ação dos efeitos farmacológicos da droga. ALVES et al. (1996) também observaram modificações quando empregaram MMC em superfície ocular íntegra de coelhas, mesmo em baixas doses e por curto espaço de tempo.

O epitélio corneano tem capacidade de auto-regeneração rápida. Essa peculiaridade se deve às células germinativas localizadas no limbo. Como a MMC induziu alterações morfométricas significativas no epitélio corneano, inclusive no limbo, justifica-se a realização de estudo para avaliação do padrão de

diferenciação das células epiteliais da córnea, através da análise imuno-histoquímica.

Os resultados obtidos nesta pesquisa, após instilação de MMC a 0,02%, em epitélio íntegro de coelho, evidenciaram que não ocorreu alteração no padrão de diferenciação celular. Na região central da córnea observou-se reação das expressões das citoceratinas com o anticorpo monoclonal AE₅, como foi observado por SCHERMER et al.(1986) e KIRITOSHI et al. (1991) que, sem uso de drogas, demonstraram que somente as células epiteliais corneanas diferenciadas expressam citoceratinas que reagem com anticorpo monoclonal AE₅, considerado marcador específico da célula epitelial corneana diferenciada. (Quadro 1 e Figura 2) Na região do limbo, as células epiteliais reagiram com o anticorpo monoclonal AE₁, porque as células germinativas que estão localizadas na camada basal do epitélio do limbo corneo-conjuntival, não são células epiteliais diferenciadas, portanto não reagem com AE₅. (Quadro 1 e Figura 1)

O maior avanço no campo da biologia celular epitelial da córnea na última década, foi a localização das células germinativas epiteliais no limbo, comprovada pela retirada da porção límbica do epitélio e pela diminuição da capacidade regenerativa do epitélio da córnea (HUANG & TSENG, 1991).

SHAPIRO et al.(1985) demonstraram que, 4 dias após a realização de defeito no epitélio superficial da córnea, existia reparação da área danificada e alta taxa de mitose. Baseado nos achados de HUANG & TSENG (1991) e SHAPIRO et al. (1985), resolveu-se pesquisar qual o resultado que se obteria danificando a superfície do epitélio da córnea, previamente submetido ao uso tópico de MMC a

0,02%, 2 gotas, 4 vezes ao dia, durante 14 dias, com intuito de poder estimular a diferenciação das células germinativas límbicas. Pela adoção desse modelo experimental nesta pesquisa, não se verificou influência da MMC na diferenciação do epitélio corneano.

MATTAR (1994) também demonstrou que a reparação de defeito epitelial da córnea não era influenciada pelo uso prévio da droga. JABBUR et al. (1994) verificaram que, após 3 meses do uso tópico da droga, em defeito epitelial superficial, foi possível identificar interferência na proliferação das células e no processo de diferenciação do epitélio da córnea de coelhos.

A vantagem do uso da MMC é sua longa ação sobre a proliferação de fibroblastos (JAMPEL, 1992). A proliferação de fibroblastos tem sido o grande problema das cirurgias filtrantes de glaucoma e de exérese de pterígio. A MMC aumenta a eficácia das cirurgias filtrantes (COSTA et al., 1996; HUTCHINSON et al., 1994; MANDIA, 1997; PERKINS et al., 1998; SUSANNA Jr. et al., 1994; TAKAHASHI et al., 1995) e previne a recorrência de pterígio em numerosos estudos (CARDILLO et al., 1995a; KUNITOMO & MORI, 1963; PANDA et al., 1998; POTÉRIO et al., 1998). Uma simples aplicação de MMC tem efeito de longa ação sobre inflamação e cicatrização da conjuntiva. Também tem sido associada com numerosas complicações depois da cirurgia filtrante de glaucoma (HIGGINBOTHAM, et al., 1996; ORAM et al., 1995; ROBIN, et al., 1997) e de pterígio (FUJITANI et al., 1993; ROSENTHAL et al., 1993; RUBINFELD et al., 1992).

Neste estudo não foi verificada complicações atribuídas ao uso da MMC a 0,02%, 4 vezes ao dia, durante 14 dias. SAMPAIO et al. (1995) não observaram alterações na córnea quando instilaram MMC, nas 2 concentrações menores, 0,02% e 0,04%. FRUCHT-PERY et al. (1997) também não relataram complicações após a utilização da MMC, na mesma dose e concentração usada neste experimento, no tratamento de neoplasia intraepitelial corneo-conjuntival. DONNENFELD et al. (1999) após injeções subconjuntivais de MMC a 0,02%, na dose de 0,25 ml, em ambas conjuntivas bulbar superior e inferior para o tratamento de pterígio ocular cicatricial, não observaram complicações inerentes a droga. Eles atribuem o fato de não verificarem presença de complicações após o uso da MMC, como ocorre nas cirurgias filtrantes de glaucoma e de pterígio, provavelmente devido à preservação de epitélio intacto e ao fato de as injeções serem dentro do espaço subconjuntival. A exposição da superfície do epitélio à MMC é mínima.

Os resultados desta investigação demonstraram baixo potencial tóxico do uso da mitomicina C em superfície ocular íntegra de coelhos, na concentração de 0,02%, instilada 4 vezes ao dia, durante 14 dias.

CONCLUSÕES

6. - CONCLUSÕES

O emprego de MMC a 0,02%, 2 gotas, 4 vezes ao dia, durante 14 dias, no epitélio íntegro da córnea de coelhos, permitiu deduzir as seguintes conclusões:

- 1) do ponto de vista clínico foi registrado hiperemia conjuntival a partir do 4º dia de instilação da droga, que desapareceu 7 dias após sua suspensão.
- 2) do ponto de vista morfométrico foram verificadas alterações significativas no epitélio da córnea, caracterizadas por aumento da área epitelial, hipertrofia da célula epitelial, redução da relação núcleo-citoplasma, diminuição do número de núcleos e do número de núcleos redondos.
- 3) o emprego da análise morfométrica quantitativa mostrou-se adequado e forneceu subsídio para compreensão da natureza dos mecanismos envolvidos na ação da mitomicina C no epitélio da córnea.
- 4) do ponto de vista imuno-histoquímico, o uso tópico de mitomicina C não determinou alterações no padrão de diferenciação celular, tanto no epitélio íntegro quanto naquele que sofreu remoção da área central da córnea.
- 5) os resultados deste estudo sugerem baixa toxicidade associada com o uso tópico de mitomicina C em epitélio corneano íntegro de coelhos.

SUMMARY

SUMMARY

This study was performed to evaluate the effects of mitomycin C eye drops (0,2mg/ml) on the corneal epithelium of rabbits. It was investigated the changes in clinical examination, histopathologic and immunohistochemical analysis.

Mitomycin C and distilled water (controls) were instilled 4 times daily for 14 consecutive days in the eyes with intact ocular surface. The ocular surface was evaluated by slit-lamp examination, during the days of the drug instillation. The animals in the 15th, 50th and 100th day of the experiment were sacrificed.

The histopathologic analysis of the corneal epithelium was complemented by morphometry. It was studied the epithelium area, number of nuclei, number of round nuclei, nucleus-cytoplasm relation, epithelial cells area (nucleus and cytoplasm).

The immunohistochemical studies used monoclonal antibodies to cytokeratins (AE1 and AE5).

During the use of mitomycin C eye drops mild conjunctival hiperemia was detected. It disappeared 7 days after the drug suspension. There was no other clinical sign by slit-lamp examination. It didn't detect histopathologic alterations in the corneal epithelium, it was considered the epithelium continuity, maturation and atypical cells presence. The morphometric analysis was performed by point counting under light microscopy. It showed variations characterized by alteration of the epithelium area, the nucleus area and cytoplasm area, increase of the

epithelial cell, alteration of the nucleus-cytoplasm relation and decrease of the nuclei number.

The use of mitomycin C 0,02%, it didn't influence in the differentiation pattern of the cornea epithelial cell.

The results of this investigation, in this study conditions, showed that mitomycin C 0,02%, instilled 4 times daily for 14 consecutive days, it was showed low toxic potential in intact ocular surface.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M.R. - Efeitos do uso tópico da mitomicina C na superfície córneo-conjuntival de coelhas. São Paulo, 1995. (Tese - Livre Docência - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo)

ALVES, M.R.; SALDIVA, P.H.N.; LEMOS, M.; KARA-JOSÉ, N. – Efeitos do uso tópico da mitomicina C no epitélio corneano de coelhas. Análise histopatológica pela morfometria. **Arq. Bras. Oftal.**, **59(5)**:431-7, 1996.

ALVES, M.R. & KARA-JOSÉ, N. Reepitelização. - In: BELFORT Jr., R. & KARA-JOSÉ, N., ed. **Córnea: clínica-cirúrgica**. São Paulo, Roca, 1997. p.27-32.

ANDO, H.; IDO, T.; KAWAI, Y.; YAMAMOTO, T.; KITAZAWA, Y. - Inhibition of corneal epithelial wound healing. A comparative study of mitomycin C and 5-fluorouracil. **Ophthalmology**, **99(12)**:1809-14, 1992.

ARFFA, R.C. Anatomy. In: GRAYSON, M., ed. - **Grayson's diseases of the cornea**. 3.ed; St. Louis, Mosby, 1991. p.1-16.

BERGMAN, R.H.& SPIGELMAN, A.V. The role of fibroblast inhibitors on corneal healing following photorefractive keratectomy with 193-nanometer excimer laser in rabbits. **Ophthalmic. Surg.**, **25**:170-4, 1994.

BINDER, P.S.; WICKHAN, M.G.; ZAVALA, E.Y., AKERS, P.H. - Corneal anatomy and wound healing. In: SYMPOSIUM ON MEDICAL AND SURGICAL DISEASES OF THE CORNEA. Transactions of New Orleans Academy of Ophthalmology, St Louis, Mosby, 1980. p.1-35.

- BISTNER, S.I.; AGUIRRE, G.; BATIK, G. – **Atlas of veterinary ophthalmic surgery**. Philadelphia, Saunders, 1977. 302p.
- BUCK, R.C. – Measurement of centripetal migration of normal corneal epithelial cells in the mouse. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **26**:1296-9, 1985.
- BURSTEIN, N.L. – Corneal cytotoxicity of topically applied drugs, vehicles and preservatives. **Surv. Ophthalmol.**, **25**:15-30, 1980.
- CALABRESI, P. & PARKS JR., R.E. – Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: In: HARDMAN, J.G. & LIMBIRD, L.E., ed. – **Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed., México, McGraw-Hill, 1996. p.903-8.
- CALABRESI, P. & PARKS JR., R.E. – Agentes antiproliferativos e drogas usadas na imunossupressão. In: GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F., ed. – **Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 7ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1987. p.817-56.
- CARDILLO, J.A.; ALVES, M.R.; AMBRÓSIO, L.E.; POTÉRIO, M.B.; KARA-JOSÉ, N. – Single intraoperative application versus postoperative mitomycin C eye drops in pterygium surgery. **Ophthalmology**, **102(12)**:1942-52, 1995a.
- CARDILLO, J.A.; KARA-JOSÉ, N.; ALVES, M.R.; POTÉRIO, M.B.; COELHO, R.P.; AMBRÓSIO, L.E. – Instilação do colírio de mitomicina C no pós-operatório do pterígio primário. **Arq. Bras. Oftal.**, **58(2)**:138-40, 1995b.
- CARVALHO, M.J.; NEVES, R.A.; RECALDE, M.L.; PRATA Jr., J.; MELLO, P.A.A.; MINCKLER, D.S. – Trabeculectomia com mitomicina C em glaucomas associados à uveítes. **Arq. Bras. Oftal.**, **56**:205, 1993.

- CHABNER, B.A.; ALEGRA, C.J.; CURT, G.A.; CALABRESI, P. - Agentes antineoplásicos. In: HARDMAN, J.G. & LIMBIRD, L.E., ed. - **Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed., México, McGraw-Hill, 1996. p.909-49.
- CHEN, C. W. - Enhanced intraocular pressure controlling effectiveness of trabeculectomy by local application of mitomycin C. **Trans. Asia Pacific. Acad. Ophthalmol.**, **9**:172-7, 1983.
- CHEN, P.P.; ARIYASU, R.G.; KAZA, V.; LaBREE, L.D.; McDONNELL, P.J. - A randomized trial comparing mitomycin C and conjunctival autograft after excision of primary pterigium. **Am. J. Ophthalmol.**, **120**(.2):151-60, 1995.
- CHEN, W.Y.W. & TSENG, S.C.G. - Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **31**:1301, 1990.
- CHEN, W.Y.W. & TSENG, S.C.G. - Differential intrastromal invasion by normal ocular surface epithelia is mediated by different fibroblasts. **Exp. Eye Res.**, **61**:521-33, 1995.
- CHEW, S.J.; BEUERMAN, R.W.; KAUFMAN, H.E. - In vivo assesment of corneal stromal toxicity by tandem scanning confocal microscopy. **Lens Eye Toxic. Res.**, **9**(3-4):275-92, 1992.
- COSTA, V.P.; MOSTER, M.R.; WILSON, R.P.; SCHMIDT, C.M.; GANDHAM, S.; SMITH, M. - Effects of topical Mitomycin C on primary trabeculectomies and combined procedures. **Br. J. Ophthalmol.**, **77**:693-7, 1993a.

- COSTA, V.P.; SPAETH, G.L.; EIFERMAN, R.A.; ORENGO-NANIA, S. - Wound healing modulation in glaucoma filtration surgery. **Ophthalmic. Surg.**, **24**:152-70, 1993b.
- COSTA, V.P.; COMEGNO, P.E.; VASCONCELOS, J.P.; MALTA, R.F.; KARA-JOSÉ, N. - Low-dose mitomycin C trabeculectomy in patients with advanced glaucoma. **J. Glaucoma**, **5(3)**:193-9, 1996.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; SHOEN, F.J. - Cellular injury and cellular death. In: - COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, P. - **Robbins Pathologic Basis of Disease**. 6.ed., Philadelphia, Saunders, 1994a. 1425p.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; SHOEN, F.J. - Cellular growth and differentiation: normal regulation and adaptations. In: - COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, P. - **Robbins Pathologic Basis of Disease**. 6.ed., Philadelphia, Saunders, 1994b. 1425p.
- COTSARELIS, G.; CHEN, S-Z.; DONG, G.; SUN, T-T.; LAVKER, R.M. - Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. **Cell.**, **57**:201-9, 1989.
- CROOKE, S.T. & BRADNER, W.T. - Mitomycin C : a review. **Cancer Treatment Reviews**, **3**:121-39, 1976.
- CRUZ, O.A. - Evaluation of mitomycin to limit postoperative adhesions in strabismus surgery. **J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus**, **33**:89-92, 1996.
- DANOPOULUS, E.D.; DANOPOULOU, I.E.; LIARIKOS, S.B., MERKURIS, K.M. - Effects of urea treatment in malignancies of the conjunctiva and cornea. **Ophthalmologica**, **178**:198-203, 1979.

- DANJO, S.; FRIEND, J.; THOFT, R.A. – Conjunctival epithelium in healing of corneal epithelial wounds. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **28**:1445-9, 1987.
- DOHLMAN, C.H. - The function of the cornea epithelium in health and disease. **Invest. Ophthalmol.**, **10**:383-407, 1971.
- DONNENFELD, E.C.; PERRY, H.D.; WALLERSTEIN, A.; CARONIA, R.M.; KANELLOPOULOS, A.J.; SFORJA, P.D.; D'AVERSA, G. – Subconjunctival mitomycin C for the treatment of ocular cicatricial pemphigoid. **Ophthalmology**, **106**(1):72-9, 1999.
- DUA, H.S.; GOMES, J.A.P.; SINGH, A. – Corneal epithelial wound healing. **Brit. J. Ophthalmol.**, **78**:401-8, 1994.
- DUNN, J.P.; SEAMONE, C.D.; OSTLER, H.B.; NICKEL, B.L.; BEALLO, A. - Development of scleral ulceration and calcification after pterygium excision and mitomycin therapy. **Am. J. Ophthalmol.**, **112**:343-4, 1991.
- EBATO, B.; FRIEND, J.; THOFT, R. – Comparison of central and peripheral corneal epithelium in tissue culture. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **28**:1450-6, 1987.
- EBATO, B.; FRIEND, J.; THOFT, R. – Comparison of limbal and peripheral corneal epithelium in tissue culture. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **29**:1533-7, 1988.
- ELKON, D. & CONSTABLE, W.C. - The use of strontium-90 in the treatment of carcinoma in situ of the conjunctiva. **Am. J. Ophthalmol.**, **87**:84-6, 1979.

- ERIE, J.C.; CAMPBELL, R.J.; LIESEGANG, T.J. - Conjunctival and corneal intraepithelial and invasive neoplasia. **Ophthalmology**, **93**:176-85, 1986.
- EWING-CHOW, D.A.; ROMANCHUK, K.G.; GILMUR, G.R.; UNDERHILL, J.H.; CLIMENHAGA, D.B. - Corneal melting after pterygium removal followed by topical mitomycin C therapy. **Can. J. Ophthalmol.**, **27(4)**:197-9, 1992.
- FERRY, A.P.; MELTZER, M.A.; TAUB, R.N. - Immunotherapy with dinitrochlorobenzene (DNCB) for recurrent squamous cell tumor of conjunctiva. **Trans. Am. Ophthalmol. Soc.**, **74**:154-71, 1976.
- FIGUEIREDO, R.S.; ARAUJO, S.V.; COHEN, E.J.; RAPUANO, C.J.; KATZ, L.J.; WILSON, R.P. - Management of coexisting corneal disease and glaucoma by combined penetrating keratoplasty and trabeculectomy with mitomycin-C. **Ophthalmic. Surg. Lasers (United States)**, **27(11)**:903-9, 1996.
- FINGER, PT. & McCORNICK, S.A. - Topical Mitomycin C chemotherapy for conjunctival melanoma. **Ophthalmology**, **101(suppl)**:109-110, 1994.
- FRANKE, W.W.; SCHILLER, D.L.; MOLL, R. - Diversity of cytokeratins differentiation specific expressions of cytokeratin polypeptide in epithelial cells and tissues. **J. Mol. Biol.**, **153**:933-59, 1981.
- FRAUNFELDER, F.T. & WINGFIELD, D. - Management of intraepithelial conjunctival tumors and squamous cell carcinomas. **Am. J. Ophthalmol.**, **87**:359-63, 1983.
- FRUCHT-PERY, J. & ILSAR, M. - The use of low-dose Mitomycin C for prevention of recurrent pterygium. **Ophthalmology**, **101**:759-62, 1994.

FRUCHT-PERY, J.; ILSAR, M.; HEMO, I. - Single dosage of Mitomycin C for prevention of recurrent pterygium: preliminary report. **Cornea**, **13**:411-3, 1994.

FRUCHT-PERY, J. & ROZENMAN, Y. - Mitomycin C therapy for corneal intraepithelial neoplasia. **Am. J. Ophthalmol.**, **117**:164-8, 1994.

FRUCHT-PERY, J. & PE'ER, J. - Use of mitomycin C in the treatment of conjunctival primary acquired melanosis with atypia. **Arch. Ophthalmol.**, **114**:1261-4, 1996.

FRUCHT-PERY, J.; SUGAR, J.; BAUM, J.; STUPHIN, J.E.; PE'ER, J.; SAVIR, H.; HOLLAND, E.J.; MEISLER, D.M.; FOSTER, J.A.; FOLBERG, R.; ROZENMAN, Y. - Mitomycin C treatment for conjunctival - corneal intraepithelial neoplasia - a multicenter experience. **Ophthalmology**, **104(12)**:2085-93, 1997.

FUJITANI, A.; HAYASAKA, S.; SHIBUYA, Y.; NODA, S. - Corneoscleral ulceration and corneal perforation after pterygium excision and topical mitomycin C therapy. **Ophthalmologica**, **207**:162-4, 1993.

GROSSNIKLAUS, H.E. & AABERG, T.M. - Mitomycin C treatment of conjunctival intraepithelial neoplasia. **Am. J. Ophthalmol.**, **124(3)**:381-3, 1997.
[Editorial]

GUNDERSEN, H.J.G. & JENSEN, E.B. - The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **J. Microsc.**, **147**:229-63, 1987.

- HATA, T.; SANO, R.; SUGAWARA, R.; MATSUMAE, A.; KANAMORI, K.; SHIMA, T.; HOSHI, T. - Mitomycin, a new antibiotic from *Streptomyces*. **J. Antib. (Tokyo) Ser. A.**, 9:141, 1956.
- HAUS, C.M. & GALAND, A.L. - Mitomycin against posterior capsular opacification: an experimental study in rabbits. **Br. J. Ophthalmol.**, 80:1087-91, 1996.
- HEIGLE, T.J.; STULTING, R.D.; PALAY, D.A. - Treatment of recurrent conjunctival epithelial neoplasia with topical mitomycin C. **Am. J. Ophthalmol.**, 124(3):397-9, 1997.
- HIGGINBOTHAM, E.J.; STEVENS, R.K.; MUSCH, D.C.; KARP, K.O.; LICHTER, P.R.; BERGSTROM, T.J.; SKUTA, G.L. - Bleb-related endophthalmitis after trabeculectomy with mitomycin C. **Ophthalmology**, 103(4):650-6, 1996.
- HIRST, L.W.; KENYON, K.R.; FOGLE, J.A.; HANNINEN, L.; STARK, W.J. - Comparative studies of corneal surface injury in the monkey and rabbit. **Arch. Ophthalmol.**, 99:1066-73, 1981.
- HOGAN, M.J.; ALVARADO, J.A.; WEDELL, J.E. - **Hystology of the human eye**. Philadelphia, W.B. Saunders, 1971. p.65-82.
- HOLZCHUH, N.; ALVES, M.R.; SANTO, R.M.; MATAYOSHI, S.; KARA-JOSÉ, N. - Efeitos do uso do colírio de mitomicina C na superfície ocular de coelhos. **Rev. Med. São Paulo**, 76(6):302-305, 1997.
- HUANG, A.J.W. & TSENG, S.C.G. - Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 32(1):96-105, 1991.

- HUTCHINSON, A.K.; GROSSNIKLAUS, H.E.; BROWN, R.H.; McMANUS, P.E.; BRADLEY, C.K. - Clinicopathologic features of excised mitomycin filtering blebs. **Arch. Ophthalmol.**, **112**:74-9, 1994.
- JABBUR, N.S.; BLAIR, S.D.; RUBINFELD, R.S.; ZIESKE, J.D.; FOSTER, C.S. - The effect of mitomycin C on corneal limbal stem cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **35**(Suppl):1797, 1994.
- JAMPEL, H.D. - Effect of brief exposure to mitomycin C on viability and proliferation of cultured human Tenon's capsule fibroblasts. **Ophthalmology**, **99**:1471-6, 1992.
- JAMPEL, H.D.; PASQUALE, L.R.; DIBERNARDO, C. - Hypotony maculopathy following trabeculectomy with mitomycin C (Case report). **Arch. Ophthalmol.**, **110**:1049-50, 1992.
- JONES, D.B.; WILHELMUS, K.R.; FONT, R.L. - Beta irradiation of recurrent corneal intraepithelial neoplasia. **Trans. Am. Ophthalmol. Soc.**, **89**:285-301, 1991.
- KAO, S.C.S.; LIAO, C.L.; TSENG, J.H.S.; CHEN, M.S.; HOU, P.C. - Dacryocystorhinostomy with intraoperative mitomycin C. **Ophthalmology**, **104**(1):86-91, 1997.
- KATO, E.T.; MACRUZ, E.; MORAIS, L.; SABROSA, N.A.; HOLZCHUH, N.; ALVES, N.R.; KARA-JOSÉ, N. - Tumores conjuntivais: ocorrência na clínica oftalmológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (SP) no ano de 1995. **Rev. Bras. Oftalmol.**, **55**(12):41-4, 1996.

- KENNEDY, K.A.; ROCKWELL, S.; SARTORELLI, A.C. - Preferential activation of mitomycin C to cytotoxic metabolites by hypoxic tumor cells. **Cancer Res.**, **40**:2356-60, 1980.
- KENYON, K.R. - Anatomy and pathology of the ocular surface. In: THOFT, R.A. & FRIEND, J. - **The ocular surface**. International Ophthalmology Clinics. Boston, Little Brown, 1979, p.3-36. v.19
- KHAW, P.T.; SHERWOOD, M.B.; MacKAY, S.L.D.; ROSSI, M.J.; SCHULTZ, G. - Five-minute treatments with fluorouracil, floxuridine and mitomycin have long-term effects on human Tenon's capsule fibroblasts. **Arch. Ophthalmol.**, **110**:1150-4, 1992.
- KHAW, P.T.; DOYLE, J.W.; SHERWOOD, M.B.; GRIERSON, I.; SCHULTZ, G.; McGORRAY, S. - Prolonged localized tissue effects from 5-minute exposures to fluorouracil and mitomycin C. **Arch. Ophthalmol.**, **111**:263-7, 1993.
- KHOURY, J.M.; JOOS, K.M.; SHEN, J.H.; DAVIS, D.; O'DAY, D.M. - Half corneal light shield as a delivery system for standardized application of mitomycin C. **J. Glaucoma**, **7**(1):8-11, 1998.
- KIRITOSHI, A.; SUNDAR RAJ, N.; THOFT, R.A. - Differentiation in cultured limbal epithelium as defined by keratin expression. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **32**(12):3073-7, 1991.
- KITAZAWA, Y.; SUEMORI-MATSUSHITA, H.; YAMAMOTO, T.; KAWASE, K. - Low-dose and high-dose mitomycin trabeculectomy as an initial surgery in primary open-angle glaucoma. **Ophthalmology**, **100**:1624-28, 1993.

KLYCE, F.D.C. & BEVERMAN, R.W. - Structure and function of the cornea. In: KAUFMAN, H.E.; BARROW, B.A.; McDONALD, M.B.; WALTMAN, S.R. - **The cornea**. New York, Churchill Livingstone, 1988. p.5-15.

KUNITOMO, N. & MORI, S. - Studies on the pterygium. Part 4. A treatment of the pterygium by mitomycin C instillation. **Acta Soc. Ophthalmol. Jap.**, **67**:601-7, 1963.

LAVKER, R.M.; DONG, G.; COTSARELIS, G.; SUN, T-T. - Limbal basal epithelial cells display characteristics consistent with stem cells from various stratifying epithelia. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **29(suppl)**:191, 1988.

LEE, D.A.; LEE, T.C.; CORTES, A.E.; KITADA, S. - Effects of mithramycin, mitomycin, daunorubicin, and bleomycin on human subconjunctival fibroblast attachment and proliferation. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **31**:2136-44, 1990.

LOUD, A.V. & ANVERSA, P. - Biology of disease - morphometric analysis of biologic processes. **Lab. Invest.**, **50(3)**:250-61, 1984.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. - **Métodos quantitativos em morfologia**. Rio de Janeiro, EDUERJ, 1995. 131p.

MANDIA Jr., C. - Trabeculectomia com mitomicina C no tratamento de glaucomas refratários. São Paulo, 1997. (Tese - Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo)

MATTAR, D.B.; ALVES, M.R.; SILVA, M.H.T.; KARA-JOSÉ, N. - Estudo comparativo da ação do tiotepa e da mitomicina C na reparação do epitélio corneano, em coelhas. **Arq. Bras. Oftal.**, **57(4)**:270-3, 1994.

- MATTAR, D.B. - Contribuição ao estudo dos efeitos do uso tópico da mitomicina C na regeneração do epitélio corneano em coelhas. Estudo experimental. São Paulo, 1994. (Tese - Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo)
- MATTAR, D.B.; ALVES, M.R.; SILVA, M.H.T.; KARA-JOSÉ, N. - Estudo da influência da aplicação subconjuntival da mitomicina C na reparação de defeito epitelial corneano em coelhas. **Arq. Bras. Oftal.**, **58(1)**:65-7, 1995.
- McDERMOTT, M.L. - The corneal epithelium. In: PODOS, S.M. & YANOFF, M. - External diseases: cornea, conjunctiva, sclera, eyelids, lacrimal system. London, Mosby, 1994. p.4.1-4.12. v.8.
- McDONALD, M.B.; FRANTZ, J.M.; KLYCE, S.D. - Central photorefractive keratectomy for myopia. **Am. J. Ophthalmol.**, **108**:799-808, 1990.
- MÉGEVAND, G.S.; SALMON, J.F.; SCHOLTZ, R.P.; MURRAY, A.D.N. - The effect of reducing the exposure time of mitomycin C in glaucoma filtering surgery. **Ophthalmology**, **102(1)**:84-90, 1995.
- MERMOUD, A.; SALMON, J.F.; MURRAY, A.D.N. - Trabeculectomy with mitomycin glaucoma in blacks. **Am. J. Ophthalmol.**, **116**:72-8, 1993.
- MILANI, J.A. - Contribuição ao estudo dos efeitos do uso tópico da ciprofloxacina na regeneração do epitélio corneano em coelhos. São Paulo, 1992. (Tese - Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo)

MILLER, M.H.; GRIERSON, I.; UNGER, W.I.; HITCHINGS, R.A. – Wound healing in an animal model of glaucoma fistulizing surgery in the rabbit. **Ophthalmic. Surg.**, **20(5)**:350-7, 1989.

MINGUINI, N. - Uso de mitomicina-C em cirurgia de estrabismo: influência na produção de fibrose cicatricial em coelhos. Campinas, São Paulo, 1999. (Tese - Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas)

MORI, S.; MURAKAMI, N.; KUNITOMO, N. - Postoperative treatment of pterygium with mitomycin C: a clinical follow-up. **Jap. J. Ophthalmol.**, **12**:30-6, 1968.

MOROI, S.E. & LICHTER, P.R. - Farmacologia ocular. In: HARDMAN, J.G. & LIMBIRD, L.E., ed. - **Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. México, McGraw-Hill, 1996. p.1201-22

MOSTER, M.R.; COSTA, V.P.; WILSON, R.P.; SCHIMIDT, C.M. - Complications of topical intraoperative subconjunctival mitomycin C in glaucoma filtration surgery. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **34(Suppl)**:730, 1993.

NOWELL, P.C. - Mitotic inhibition and chromosome damage by mitomycin in human leukocyte cultures. **Exp. Cell. Res.**, **33**:445-9, 1964.

OH, S.O.; CHANG, B.L.; LEE, J. - Effects of mitomycin C on delayed adjustment in experimental strabismus surgery. **Korean J. Ophthalmol.**, **9**:51-8, 1995.

ORAM, O.; GROSS, R.L.; WILHELMUS, K.R.; HOOVER, J.A. – Necrotizing keratitis following trabeculectomy with mitomycin. **Arch. Ophthalmol.**, **113(1)**:19-20, 1995.

- PALMER, S.S. - Mitomycin as adjunct chemotherapy with trabeculectomy. **Ophthalmology**, **98**:317-21, 1991.
- PANDA, A.; DAS, G.K.; TULI, S.W.; KUMAR, A. - Randomized trial of intraoperative mitomycin C in surgery for pterygium. **Am. J. Ophthalmol.**, **125**(1):59-63, 1998.
- PASQUALE, L.R.; THIBAUT, D.; DORMAN-PEASE, M.E.; QUIGLEY, H. A.; JAMPEL, H.D. - Effect of topical mitomycin C on glaucoma filtration surgery in monkeys. **Ophthalmology**, **99**:14-8, 1992.
- PERKINS, T.W.; ÇARDAKLI, U.F.; EISELE, J.R.; KAUFMAN, P.L.; HEATLEY, G.A. - Adjunctive mitomycin C in Molteno implant surgery. **Ophthalmology**, **102**(1):91-7, 1995.
- PERKINS, T.W.; GANGNON, R.; LADD, W.; KAUFMAN, P.L.; HEATLEY, G.A. - Trabeculectomy with mitomycin C: intermediate term results. **J. Glaucoma**, **7**(4):230-6, 1998.
- PINILLA, I.; LARROSA, J.M.; POLO, V.; HONRUBIA, F.M. - Subconjunctival injection of low doses of mitomycin C: effects on fibroblast proliferation. **Ophthalmologica**, **212**:306-9, 1998.
- POTERIO, M.B.; ALVES, M.R.; CARDILLO, J.A.; KARA-JOSÉ, N. - Na improved surgical technique for pterygium excision with intraoperative application of mitomycin C. **Ophthalmic. Surg. Lasers**, **29**(8):685-7, 1998.
- POWER, W.J. & NEVES, R.A. - Anatomia e fisiologia da córnea. In: BELFORT Jr., R. & KARA-JOSÉ, N. ed. - **Córnea: clínica-cirúrgica**. São Paulo, Roca, 1997. p.3-15

ROBIN, A.L.; RAMAKRISHNAN, R.; KRISHNADAS, R.; SMITH, S.D.; KATZ, J.D.; SELVARAJ, S.; SKUTA, G.L.; BHATNAGAR, R. - A long-term dose-response study of mitomycin in glaucoma filtration surgery. **Arch. Ophthalmol.**, **115**:969-74, 1997.

ROSENTHAL, G.; SHOHAM, A.; LIFSHITZ, T.; BIEDNER, B.; YASSUR, Y. - The use of mitomycin in pterygium surgery. **Ann. Ophthalmol.**, **25**:427-8, 1993.

RUBINFELD, R.S.; PFISTER, R.R.; STEIN, R.M.; FOSTER, C.S.; MARTIN, N.F.; STOLERU, S.; TALLEY, A.R.; SPEAKER, M.G. - Serious complications of topical mitomycin C after pterygium surgery. **Ophthalmology**, **99(11)**:1647-54, 1992.

SAMPAIO, M.W. - Contribuição ao estudo dos efeitos do uso tópico da mitomicina C em olhos de ratas. Estudo experimental. São Paulo, 1992. 68p. (Tese - Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo)

SAMPAIO, M.W.; KARA-JOSÉ, N.; ALVES, M.R. - Efeitos do uso tópico de mitomicina C em olhos de ratas. **Arq. Bras. Oftal.**, **58(1)**:56-9, 1995.

SANTO, R.M.; YAMAGUCHI, T.; KANAI, A.; ABE, H.; SUDA, K. - Characterization of rabbit ocular surface epithelial cells after keratoepithelioplasty. In: ASSOCIATION FOR RESEARCH IN VISION AND OPHTHALMOLOGY ANNUAL MEETING, Sarasota/Flórida, 1994.

SANTO, R.M. - Disfunções do limbo corneioconjuntival. In: - ALVES, M.R. & KARA-JOSÉ, N. ed. **Conjuntiva cirúrgica**. São Paulo, Roca, 1999. v.1, p.165-71

- SCHERMER, A.; GALVIN, S.; SUN, T-T. - Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. **J. Cell. Biol.**, **103**:49-62, 1986.
- SCHIPPER, I.; SUPPELT, C.; GEBBERS, J.O. - Mitomycin C reduces scar formation after excimer laser (193 nm) photorefractive keratectomy in rabbits. **Eye**, **11**:649-55, 1997.
- SHAPIRO, M.S.; THOFT, R.A.; FRIEND, J.; PARRISH, R.K.; GRESSEL, M.G. - 5-fluorouracil toxicity to the ocular surface epithelium. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **26**: 580-3, 1985.
- SHIELDS, M.B.; SCROGGS, M.W.; SLOOP, C.M.; SIMMONS, R.B. - Clinical and histopathologic observations concerning hypotony after trabeculectomy with adjunctive mitomycin C. **Am. J. Ophthalmol.**, **116**:673-83, 1993.
- SINGH, G.; WILSON, M.R.; FOSTER, C.S. - Mitomycin eye drops as treatment for pterygium. **Ophthalmology**, **95**:813-21, 1988.
- SINGH, G.; WILSON, M.R.; FOSTER, C.S. - Long-term follow-up study of mitomycin eye drops as adjunctive treatment for pterygia and its comparison with conjunctival autograft transplantation. **Cornea**, **9**:331-4, 1990.
- SKUTA, G.L.; BEESON, C.C.; HIGGINBOTHAM, E.J.; LICHTER, P.R.; MUSCH, D.C.; BERGSTROM, T.J.; KLEIN, T.B.; FALCK, F.Y. - Intraoperative mitomycin versus postoperative 5-fluorouracil in high-risk glaucoma filtering surgery. **Ophthalmology**, **99**:438-44, 1992.
- SOONG, H-K. & FAIRLEY, J.A. - Actin in human corneal epithelium. **Arch. Ophthalmol.**, **103**:565-8, 1985.

- STONE, R.T.; HERNDON, L.W.; ALLINGHAM, R.R.; SHIELDS, M.B. - Results of trabeculectomy with 0,3 mg/ml mitomycin-C titrating exposure times based on risk factors for failure. **J. Glaucoma**, **7(1)**:39-44, 1998.
- SUGAR, A. - Who should receive mitomycin-C after pterygium surgery ?. - **Ophthalmology**, **99(11)**:1645-6, 1992. [Editorial]
- SUÑER, I.J.; GREENFIELD, D.S.; MILLER, M.P.; NICOLELA, M.T.; PALMBERG, P.F. - Hypotony maculopathy after filtering surgery with mitomycin C: incidence and treatment. **Ophthalmology**, **104(2)**:207-15, 1997.
- SUSANNA Jr., R.; NICOLELA, M.T.; TAKAHASHI, W.Y. - Mitomycin C as adjunctive therapy glaucoma implant surgery. **Ophthalmic. Surg.**, **25(7)**:458-62, 1994.
- SZYBALSKI, W. & IYER, V.N. In: GOTTLIEB, D. & SHAW, P.D. - **Antibiotics: mechanism of action**. New York, Springer, 1967. p.211-45
- TALAMO, J.H.; GOLLAMUDI, S.; GREEN, R.; DE LA CRUZ, Z.; FILATOV, V.; STARK, W.J. - Modulation of corneal wound healing after excimer laser keratomileusis using topical mitomycin C and steroids. **Arch. Ophthalmol.**, **109**:1141-6, 1991.
- TAKAHASHI, W.Y.; SUSANNA Jr., R.; COSTA, V.P.; MALTA, R.F.S.; VASCONCELOS, J.P. - Uso de mitomicina C sem toque conjuntival tenoniano em olhos trabeculectomizados: estudo comparativo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OFTALMOLOGIA, 28, Bahia, 1995. **Temas Livres**. São Paulo, Arq. Bras. Oftal., 1995. (Resumo)

- TERVO, T.; SULONEN, J.; VATONEN, S. - Distribution of fibronectin in human and rabbit corneas. **Exp. Eye Res.**, **42**:399-406, 1986.
- THOFT, R.A. & FRIEND, J. - The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **24**:1442-3, 1983.
- TSENG, S.C.G. - Concept and application of limbal stem cells. **Eye**, **3**:141-57, 1989.
- TSENG, S-H.; TSAI, Y-Y.; CHEN, F.K. - Successful treatment of recurrent corneal intraepithelial neoplasia with topical mitomycin C. **Cornea**, **16(5)**:595-7, 1997.
- URBAN, R.C. & KAUFMAN, L.M. - Mitomycin in the treatment of hipertrophic conjunctival scar after strabismus surgery. **J. Pediatric. Ophthalmol. Strabismus**, **31**:96-8, 1994.
- USUBA, F.S. & BATTISTELLA, R. - Uso de mitomicina C nos casos de neoplasia intra epitelial corneoconjuntival. In: KARA-JOSÉ, N. & ALVES, M.R. ed. **Conjuntiva cirúrgica**. São Paulo, Roca, 1999. 164p
- WAKAKI, S.; MARUMO, H.; TOMIOKA, K.; SHIMIZU, G.; KATO, E.; KAMADA, H.; KUDO, S.; FUJIMOTO, Y. - Isolation of new fractions of antitumor mitomycins. **Antibiot. Chemother.**, **8(5)**:228-40, 1958.
- WEIBEL, E.R. - Principles and methods for the morphometric study of the lung and others organs. **Lab. Invest.**, **12**:131-55, 1963.
- WILSON, M.W.; HUNGERFORD, J.L.; GEORGE, S.M.; MADREPERLA, S.A. - Topical mitomycin C for the treatment of conjunctival and corneal epithelial dysplasia and neoplasia. **Am. J. Ophthalmol.**, **124**:303-11, 1997.

WOO, E.; TINGEY, D.P.; MACKENZIE, G.; HOOPER, P. - Stability of the antiproliferative effect of mitomycin C after reconstitution. **J. Glaucoma**, **6(1)**:33-6, 1997.

YAMAMOTO, T.; VARANI, J.; SOONG, H.K.; LICHTER, P.R. - Effects of 5-fluorouracil and mitomycin C on cultured rabbit subconjunctival fibroblasts. **Ophthalmology**, **97**:1204-10, 1990.

YEATTS, R.P.; FORD, J.G.; STANTON, C.A.; REED, J.W. - Topical 5-fluorouracil in treating epithelial neoplasia of the conjunctiva and cornea. **Ophthalmology**, **102**:1338-44, 1995.

ANEXOS

ANEXO 1

PESO INICIAL DOS COELHOS

01. 3.830g	02. 4.050g	03. 2.550g	04. 2.650g
05. 2.530g	06. 2.480g	07. 2.500g	08. 2.700g
09. 2.950g	10. 2.910g	11. 2.450g	12. 2.530g
13. 2.250g	14. 2.160g	15. 2.850g	16. 2.490g
17. 2.540g	18. 2.600g	19. 2.710g	20. 2.830g
21. 2.620g	22. 2.350g	23. 2.850g	24. 2.400g
25. 2.920g	26. 2.910g	27. 3.200g	28. 3.220g

MÉDIA = 2.751,07143**TAMANHO DA AMOSTRA = 28****DESVIO PADRÃO = 0.4231****MÍNIMO = 2.160****MÁXIMO = 4.050**

ANEXO 2: Avaliação biomicroscópica da hiperemia dos olhos de coelhos, durante os 15 dias de instilação do colírio de mitomicina C a 0,02% (OE) e água destilada (OD).

Nº	OLHOS COELHOS		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	OE	MMC	-	-	-	+	++	++	++	+	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	OE	MMC	-	-	-	++	++	++	++	+	+	++	++	+	++	+	+	+	+	-	-	-	-
3	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	OE	MMC	-	-	-	-	+	-	-	-	+	++	+	++	+	-	+	-	-	-	-	-	-
4	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	OE	MMC	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++	+++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-
5	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	OE	MMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
6	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	OE	MMC	-	-	-	++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	-
7	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	OE	MMC	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	++	++	+	+	+	-	-	-
8	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	OE	MMC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
9	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	OE	MMC	-	-	-	-	+	+	++	++	+	+	+	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
10	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	OE	MMC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-
11	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	OE	MMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-
12	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	OE	MMC	-	-	-	-	-	+++	++	++	++	++	+	+	+++	++	+	+	+	+	+	+	-
13	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	OE	MMC	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	++	+	+	+	-
14	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	OE	MMC	-	-	-	-	-	++	++	++	+	+	++	++	+	-	-	++	++	+	+	-	-
15	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	OE	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	OE	MMC	-	-	-	++	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	++	+	+	+	-	-	-
17	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	OE	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	OE	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	OE	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	OE	MMC	-	-	-	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
21	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	OE	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	OE	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	OE	MMC	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-
24	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	OE	MMC	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	-	-
25	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	OE	MMC	-	-	-	+	+	++	++	+	+	+	+	-	-	+	+	++	+	+	+	-	-
26	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	OE	MMC	-	-	-	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	++	++	+	+	+	+	+	-
27	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	OE	MMC	-	-	-	++	++	+++	+++	++	++	+	+	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
28	OD	H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	OE	MMC	-	-	-	++	+	+	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+	-	-	-	-

OD = olho direito

OE = olho esquerdo

H₂O = água destilada

MMC = mitomicina C

(-) = ausência de hiperemia

(+) = hiperemia leve

(++) = hiperemia moderada

(+++)= hiperemia máxima

ANEXO 3. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO EPITÉLIO DA CÓRNEA

Valores de estimativa da área do epitélio corneano ($10^2 \mu\text{m}^2$) nas regiões do limbo (L) e central (C) da córnea, número (Nº) de campos avaliados nos olhos controles (CC) medicados com água destilada e, nos tratados com mitomicina C a 0,02% e, sacrificados aos 15 dias (MMC 15d), 50 dias (MMC 50d) e aos 100 dias (MMC 100d).

Nº	EPITÉLIO							
	C. C.		MMC 15d		MMC 50d		MMC 100d	
	L	C	L	C	L	C	L	C
1	22.00	29.00	27.00	40.00	23.00	24.00	20.00	41.00
2	21.00	30.00	31.00	37.00	28.00	22.00	30.00	36.00
3	25.00	31.00	29.00	43.00	27.00	20.00	30.00	35.00
4	24.00	32.00	34.00	39.00	21.00	19.00	26.00	39.00
5	20.00	30.00	30.00	36.00	20.00	30.00	28.00	37.00
6	20.00	34.00	0.00	38.00	22.00	40.00	68.00	38.00
7	20.00	30.00	0.00	37.00	21.00	31.00	80.00	33.00
8	22.00	34.00	0.00	36.00	20.00	30.00	50.00	35.00
9	22.00	27.00	0.00	35.00	28.00	36.00	41.00	32.00
10	26.00	28.00	0.00	33.00	22.00	33.00	70.00	36.00
11	25.00	40.00	10.00	46.00	30.00	25.00	13.00	13.00
12	25.00	42.00	22.00	35.00	32.00	25.00	15.00	13.00
13	33.00	38.00	20.00	22.00	32.00	32.00	10.00	15.00
14	32.00	37.00	29.00	33.00	25.00	31.00	10.00	20.00
15	32.00	38.00	28.00	39.00	30.00	25.00	10.00	20.00
16	10.00	30.00	18.00	19.00	28.00	27.00	10.00	18.00
17	10.00	28.00	20.00	25.00	20.00	27.00	10.00	17.00
18	10.00	35.00	28.00	54.00	20.00	23.00	10.00	10.00
19	12.00	40.00	20.00	45.00	19.00	24.00	16.00	12.00
20	20.00	30.00	24.00	39.00	16.00	25.00	20.00	20.00
21	30.00	21.00	29.00	32.00	23.00	23.00	14.00	20.00
22	31.00	21.00	30.00	41.00	23.00	25.00	18.00	21.00
23	22.00	29.00	30.00	30.00	24.00	30.00	29.00	22.00
24	31.00	28.00	36.00	31.00	20.00	26.00	26.00	23.00
25	23.00	25.00	42.00	37.00	27.00	25.00	24.00	20.00
26	23.00	29.00	36.00	38.00	25.00	23.00	18.00	18.00
27	28.00	20.00	28.00	32.00	24.00	22.00	20.00	16.00
28	27.00	20.00	36.00	35.00	26.00	22.00	20.00	15.00
29	30.00	24.00	32.00	35.00	35.00	31.00	20.00	20.00
30	31.00	20.00	34.00	30.00	40.00	25.00	20.00	16.00
31	41.00	16.00	41.00	21.00	30.00	22.00	10.00	18.00
32	35.00	20.00	41.00	32.00	31.00	30.00	10.00	24.00
33	34.00	19.00	33.00	37.00	22.00	30.00	13.00	11.00
34	31.00	19.00	39.00	28.00	30.00	28.00	13.00	19.00
35	30.00	17.00	36.00	29.00	34.00	19.00	17.00	16.00
36	24.00	18.00	29.00	27.00	26.00	18.00	15.00	15.00
37	18.00	20.00	28.00	31.00	40.00	23.00	10.00	15.00
38	20.00	14.00	20.00	30.00	27.00	21.00	19.00	17.00
39	20.00	17.00	27.00	28.00	30.00	32.00	10.00	14.00
40	21.00	15.00	30.00	34.00	18.00	27.00	13.00	14.00
41	19.00	20.00	30.00	30.00	24.00	65.00	20.00	18.00
42	20.00	19.00	30.00	48.00	37.00	56.00	20.00	19.00
43	20.00	17.00	20.00	40.00	35.00	47.00	20.00	23.00
44	20.00	20.00	40.00	36.00	37.00	40.00	20.00	20.00
45	19.00	20.00	36.00	31.00	29.00	35.00	20.00	20.00
46	23.00	20.00	27.00	48.00	25.00	24.00	10.00	20.00
47	30.00	16.00	31.00	32.00	29.00	34.00	14.00	23.00
48	25.00	22.00	30.00	50.00	31.00	37.00	17.00	19.00
49	23.00	20.00	30.00	31.00	30.00	35.00	19.00	0.00
50	20.00	20.00	30.00	30.00	30.00	26.00	22.00	0.00
51	14.00	20.00	66.00	25.00	20.00	30.00	20.00	20.00
52	15.00	20.00	76.00	22.00	21.00	32.00	21.00	20.00
53	18.00	21.00	64.00	22.00	20.00	39.00	13.00	17.00
54	17.00	21.00	37.00	22.00	20.00	40.00	21.00	17.00
55	21.00	20.00	37.00	30.00	20.00	40.00	17.00	17.00
56	19.00	20.00	27.00	20.00	24.00	34.00	16.00	18.00
57	20.00	18.00	19.00	20.00	20.00	38.00	21.00	19.00
58	18.00	16.00	29.00	27.00	24.00	38.00	20.00	14.00
59	15.00	18.00	20.00	20.00	17.00	24.00	14.00	11.00
60	16.00	16.00	24.00	20.00	20.00	19.00	20.00	20.00

Valores de estimativa do número de núcleos, nas regiões do limbo (L) e central (C) da córnea, número (Nº) de campos avaliados nos olhos controles (CC) medicados com água destilada e, nos tratados com mitomicina C a 0,02%. Sacrificados aos 15 dias (MMC 15d), 50 dias (MMC 50d) e aos 100 dias (MMC 100d).

Nº	NÚCLEO							
	C. C.		MMC 15 d		MMC 50 d		MMC 100 d	
	L	C	L	C	L	C	L	C
1	31.00	29.00	21.00	22.00	38.00	31.00	18.00	26.00
2	33.00	24.00	29.00	17.00	40.00	30.00	47.00	23.00
3	35.00	26.00	27.00	27.00	29.00	35.00	40.00	29.00
4	27.00	24.00	28.00	33.00	28.00	29.00	34.00	33.00
5	22.00	21.00	20.00	31.00	21.00	23.00	36.00	31.00
6	31.00	32.00	0.00	28.00	21.00	26.00	47.00	25.00
7	37.00	28.00	0.00	30.00	26.00	28.00	52.00	26.00
8	33.00	26.00	0.00	27.00	19.00	23.00	39.00	33.00
9	36.00	32.00	0.00	32.00	24.00	23.00	28.00	25.00
10	30.00	26.00	0.00	32.00	25.00	21.00	40.00	28.00
11	48.00	36.00	19.00	28.00	27.00	27.00	30.00	20.00
12	52.00	36.00	10.00	24.00	29.00	28.00	30.00	30.00
13	35.00	28.00	33.00	26.00	33.00	25.00	23.00	22.00
14	45.00	31.00	47.00	24.00	27.00	29.00	20.00	24.00
15	45.00	38.00	24.00	19.00	31.00	27.00	22.00	26.00
16	21.00	31.00	12.00	20.00	28.00	29.00	27.00	32.00
17	30.00	28.00	15.00	21.00	32.00	23.00	21.00	33.00
18	27.00	32.00	15.00	20.00	33.00	26.00	27.00	27.00
19	25.00	36.00	16.00	27.00	24.00	28.00	32.00	23.00
20	38.00	32.00	12.00	25.00	24.00	27.00	33.00	33.00
21	23.00	33.00	15.00	20.00	42.00	26.00	24.00	30.00
22	24.00	36.00	16.00	18.00	34.00	31.00	28.00	25.00
23	24.00	35.00	21.00	23.00	31.00	29.00	33.00	29.00
24	28.00	32.00	32.00	19.00	20.00	28.00	38.00	29.00
25	24.00	22.00	35.00	20.00	30.00	25.00	34.00	25.00
26	43.00	24.00	22.00	21.00	30.00	30.00	25.00	31.00
27	33.00	31.00	20.00	18.00	29.00	28.00	32.00	27.00
28	23.00	33.00	21.00	17.00	38.00	21.00	31.00	28.00
29	28.00	36.00	18.00	20.00	30.00	40.00	20.00	25.00
30	36.00	31.00	20.00	15.00	30.00	27.00	33.00	27.00
31	44.00	31.00	36.00	25.00	32.00	27.00	26.00	32.00
32	49.00	36.00	18.00	33.00	30.00	38.00	28.00	33.00
33	45.00	37.00	23.00	33.00	27.00	28.00	31.00	29.00
34	32.00	30.00	26.00	27.00	27.00	26.00	30.00	31.00
35	36.00	28.00	20.00	27.00	33.00	25.00	37.00	21.00
36	30.00	34.00	30.00	21.00	31.00	32.00	27.00	28.00
37	20.00	34.00	27.00	28.00	31.00	29.00	34.00	26.00
38	21.00	28.00	24.00	21.00	31.00	26.00	35.00	19.00
39	23.00	35.00	26.00	28.00	42.00	29.00	35.00	24.00
40	20.00	34.00	29.00	29.00	30.00	27.00	33.00	22.00
41	34.00	25.00	17.00	20.00	32.00	51.00	23.00	32.00
42	42.00	24.00	21.00	22.00	26.00	40.00	31.00	38.00
43	35.00	25.00	14.00	20.00	36.00	29.00	35.00	38.00
44	26.00	21.00	24.00	20.00	30.00	26.00	40.00	31.00
45	32.00	28.00	16.00	20.00	28.00	29.00	34.00	32.00
46	40.00	30.00	34.00	21.00	44.00	20.00	23.00	24.00
47	47.00	23.00	35.00	20.00	29.00	25.00	30.00	38.00
48	37.00	28.00	22.00	23.00	27.00	32.00	28.00	31.00
49	35.00	30.00	19.00	16.00	29.00	27.00	36.00	0.00
50	32.00	28.00	21.00	20.00	33.00	20.00	37.00	0.00
51	37.00	25.00	27.00	27.00	30.00	27.00	29.00	23.00
52	40.00	32.00	24.00	30.00	22.00	21.00	41.00	23.00
53	42.00	38.00	25.00	25.00	19.00	26.00	38.00	22.00
54	44.00	28.00	12.00	26.00	24.00	29.00	38.00	27.00
55	42.00	30.00	8.00	26.00	25.00	25.00	31.00	37.00
56	31.00	22.00	30.00	22.00	27.00	23.00	48.00	26.00
57	24.00	29.00	21.00	24.00	31.00	29.00	29.00	22.00
58	27.00	25.00	30.00	25.00	23.00	24.00	23.00	22.00
59	29.00	29.00	31.00	24.00	18.00	21.00	20.00	29.00
60	25.00	29.00	25.00	30.00	13.00	26.00	25.00	27.00

Valores de estimativa do número de núcleos redondos, nas regiões do limbo (L) e central (C) da córnea, número (Nº) de campos avaliados nos olhos controles (CC) medicados com água destilada e, nos tratados com mitomicina C a 0,02%. Sacrificados aos 15 dias (MMC 15d), 50 dias (MMC 50d) e aos 100 dias (MMC 100d).

NÚCLEO REDONDO								
	C. C.		MMC 15 d		MMC 50 d		MMC 100 d	
	L	C	L	C	L	C	L	C
1	8.00	4.00	10.00	8.00	8.00	2.00	6.00	17.00
2	10.00	7.00	6.00	7.00	11.00	3.00	8.00	11.00
3	6.00	2.00	10.00	6.00	9.00	6.00	3.00	13.00
4	6.00	4.00	9.00	9.00	1.00	9.00	8.00	17.00
5	3.00	7.00	8.00	7.00	4.00	6.00	17.00	15.00
6	6.00	4.00	0.00	5.00	9.00	4.00	36.00	5.00
7	3.00	2.00	0.00	4.00	9.00	4.00	46.00	11.00
8	8.00	2.00	0.00	6.00	5.00	4.00	31.00	8.00
9	5.00	6.00	0.00	5.00	6.00	1.00	18.00	10.00
10	7.00	3.00	0.00	3.00	5.00	1.00	33.00	9.00
11	7.00	6.00	2.00	5.00	3.00	3.00	17.00	8.00
12	6.00	7.00	6.00	5.00	4.00	5.00	15.00	16.00
13	4.00	3.00	8.00	3.00	2.00	1.00	18.00	13.00
14	5.00	2.00	10.00	3.00	3.00	2.00	14.00	12.00
15	6.00	3.00	5.00	6.00	7.00	2.00	15.00	14.00
16	0.00	2.00	0.00	6.00	1.00	5.00	13.00	24.00
17	1.00	3.00	2.00	2.00	11.00	3.00	12.00	25.00
18	0.00	1.00	3.00	4.00	10.00	2.00	15.00	13.00
19	1.00	4.00	6.00	4.00	4.00	6.00	13.00	13.00
20	4.00	5.00	5.00	4.00	3.00	5.00	17.00	17.00
21	6.00	3.00	5.00	4.00	7.00	5.00	7.00	6.00
22	5.00	4.00	4.00	2.00	6.00	3.00	7.00	3.00
23	2.00	4.00	4.00	3.00	8.00	8.00	9.00	2.00
24	3.00	3.00	3.00	6.00	2.00	4.00	6.00	5.00
25	2.00	6.00	4.00	6.00	0.00	4.00	2.00	9.00
26	4.00	5.00	8.00	4.00	1.00	5.00	3.00	7.00
27	4.00	4.00	4.00	2.00	4.00	7.00	7.00	1.00
28	4.00	2.00	4.00	0.00	5.00	3.00	4.00	6.00
29	9.00	3.00	3.00	5.00	4.00	10.00	1.00	8.00
30	4.00	4.00	2.00	2.00	6.00	2.00	6.00	7.00
31	8.00	2.00	4.00	2.00	3.00	2.00	12.00	9.00
32	4.00	4.00	3.00	1.00	3.00	5.00	12.00	22.00
33	2.00	4.00	3.00	2.00	2.00	4.00	13.00	15.00
34	3.00	3.00	3.00	3.00	5.00	5.00	10.00	16.00
35	3.00	6.00	2.00	2.00	9.00	6.00	18.00	8.00
36	10.00	1.00	2.00	3.00	14.00	3.00	15.00	13.00
37	8.00	1.00	6.00	3.00	4.00	3.00	9.00	13.00
38	4.00	0.00	6.00	2.00	5.00	3.00	12.00	11.00
39	9.00	3.00	6.00	1.00	0.00	5.00	11.00	12.00
40	6.00	0.00	6.00	2.00	2.00	6.00	14.00	9.00
41	21.00	12.00	4.00	2.00	7.00	16.00	7.00	20.00
42	35.00	11.00	2.00	4.00	4.00	8.00	15.00	27.00
43	31.00	15.00	5.00	5.00	7.00	5.00	19.00	20.00
44	17.00	9.00	2.00	3.00	5.00	5.00	24.00	15.00
45	19.00	13.00	4.00	3.00	4.00	5.00	22.00	14.00
46	21.00	14.00	3.00	5.00	9.00	5.00	8.00	10.00
47	28.00	15.00	5.00	4.00	2.00	4.00	15.00	18.00
48	19.00	17.00	4.00	3.00	4.00	2.00	15.00	20.00
49	19.00	12.00	4.00	3.00	1.00	3.00	17.00	0.00
50	15.00	19.00	6.00	4.00	3.00	3.00	23.00	0.00
51	13.00	12.00	15.00	2.00	4.00	4.00	15.00	12.00
52	22.00	23.00	10.00	4.00	3.00	3.00	25.00	12.00
53	17.00	9.00	6.00	2.00	5.00	6.00	30.00	11.00
54	22.00	17.00	2.00	2.00	3.00	7.00	26.00	16.00
55	18.00	8.00	2.00	4.00	4.00	2.00	21.00	24.00
56	19.00	10.00	8.00	6.00	1.00	5.00	29.00	16.00
57	14.00	11.00	2.00	5.00	3.00	5.00	16.00	14.00
58	15.00	11.00	5.00	2.00	3.00	3.00	12.00	12.00
59	17.00	17.00	6.00	5.00	3.00	2.00	5.00	16.00
60	11.00	13.00	6.00	0.00	6.00	5.00	11.00	17.00

Valores de estimativa da relação núcleo/citoplasma, nas regiões do limbo (L) e central (C) da córnea, número (Nº) de campos avaliados nos olhos controles (CC) medicados com água destilada e, nos tratados com mitomicina C a 0,02%. Sacrificados aos 15 dias (MMC 15d), 50 dias (MMC 50d) e aos 100 dias (MMC 100d).

RELAÇÃO NÚCLEO / CITOPLASMA								
	C. C.		MMC 15 d		MMC 50 d		MMC 100 d	
	L	C	L	C	L	C	L	C
1	.5	.23	.43	.18	.36	.23	.53	.32
2	.55	.27	.48	.26	.47	.28	.6	.47
3	.55	.3	.42	.1	.34	.34	.59	.33
4	.5	.27	.39	.24	.28	.34	.41	.43
5	.37	.32	.33	.39	.2	.33	.47	.37
6	.4	.4	0	.28	.26	.33	.38	.33
7	.59	.35	0	.34	.47	.27	.4	.26
8	.59	.29	0	.31	.45	.37	.47	.15
9	.38	.33	0	.34	.36	.23	.52	.22
10	.36	.36	0	.4	.3	.25	.51	.2
11	.53	.26	.56	.31	.27	.28	.58	.37
12	.5	.47	.56	.33	.13	.33	.5	.42
13	.41	.38	.47	.27	.28	.21	.55	.36
14	.31	.31	.32	.42	.44	.31	.37	.33
15	.37	.29	.32	.37	.21	.2	.18	.44
16	.5	.29	.29	.32	.2	.15	.62	.52
17	.9	.34	.28	.22	.37	.24	.6	.44
18	.67	.34	.36	.19	.53	.33	.3	.6
19	.42	.43	.35	.23	.59	.14	.33	.3
20	.38	.28	.33	.25	.25	.37	.47	.37
21	.39	.44	.38	.33	.52	.39	.54	.47
22	.39	.26	.38	.17	.36	.33	.35	.39
23	.45	.35	.33	.28	.37	.27	.21	.18
24	.32	.15	.29	.38	.4	.22	.36	.22
25	.19	.26	.17	.23	.35	.22	.24	.31
26	.5	.23	.3	.17	.27	.28	.47	.3
27	.29	.35	.27	.26	.31	.38	.42	.36
28	.36	.47	.3	.17	.26	.4	.28	.28
29	.1	.25	.33	.2	.21	.45	.43	.22
30	.22	.41	.27	.21	.37	.18	.37	.2
31	.45	.23	.27	.47	.29	.33	.5	.27
32	.44	.27	.19	.27	.29	.24	.62	.17
33	.5	.39	.28	.32	.44	.3	.46	.67
34	.23	.53	.14	.24	.38	.44	.7	.53
35	.21	.22	.08	.5	.39	.47	.41	.33
36	.43	.25	.44	.24	.31	.43	.54	.36
37	.67	.57	.5	.27	.25	.37	.8	.42
38	.22	.42	.6	.28	.45	.31	.59	.53
39	.53	.42	.32	.3	.48	.38	.6	.23
40	.3	.31	.21	.38	.43	.33	.46	.5
41	.56	.5	.24	.33	.26	.35	.82	.27
42	.45	.17	.16	.26	.15	.31	.63	.52
43	.55	.29	.37	.15	.23	.22	.42	.52
44	.41	.15	.25	.15	.23	.33	.5	.63
45	.3	.28	.26	.13	.29	.35	.35	.55
46	.4	.35	.07	.22	.38	.28	.7	.55
47	.43	.19	.31	.19	.41	.37	.62	.58
48	.2	.31	.38	.3	.18	.32	.57	.6
49	.27	.47	.3	.14	.32	.48	.44	0
50	.36	.45	.21	.18	.37	.32	.43	0
51	.58	.31	.29	.27	.26	.22	.58	.28
52	.43	.37	.25	.39	.35	.22	.6	.11
53	.39	.5	.16	.39	.28	.16	.75	.35
54	.4	.3	.18	.28	.58	.23	.52	.27
55	.52	.22	.17	.37	.33	.2	.53	.35
56	.21	.26	.46	.16	.28	.2	.25	.17
57	.22	.19	.44	.31	.28	.22	.4	.47
58	.33	.42	.37	.23	.32	.27	.52	.43
59	.36	.37	.44	.22	.31	.23	.28	.55
60	.43	.33	.31	.45	.11	.37	.31	.4

Valores de estimativa da área da célula do epitélio corneano ($10^2 \mu\text{m}^2$), nas regiões do limbo (L) e central (C) da córnea, número (Nº) de campos avaliados nos olhos controles (CC) medicados com água destilada e, nos tratados com mitomicina C a 0,02%. Sacrificados aos 15 dias (MMC 15d), 50 dias (MMC 50d) e aos 100 dias (MMC 100d).

ÁREA DA CELULA								
	C. C.		MMC 15 d		MMC 50 d		MMC 100 d	
	L	C	L	C	L	C	L	C
1	18.00	26.00	28.00	39.00	23.00	22.00	17.00	41.00
2	18.00	30.00	29.00	38.00	30.00	25.00	30.00	36.00
3	20.00	30.00	26.00	38.00	29.00	32.00	27.00	33.00
4	22.00	33.00	33.00	37.00	28.00	29.00	22.00	37.00
5	19.00	28.00	30.00	38.00	15.00	24.00	21.00	35.00
6	20.00	30.00	0.00	36.00	19.00	24.00	63.00	36.00
7	17.00	28.00	0.00	38.00	19.00	26.00	79.00	35.00
8	17.00	34.00	0.00	29.00	20.00	19.00	49.00	33.00
9	21.00	27.00	0.00	32.00	22.00	22.00	42.00	32.00
10	25.00	25.00	0.00	30.00	20.00	24.00	63.00	34.00
11	28.00	38.00	9.00	51.00	29.00	25.00	12.00	8.00
12	28.00	40.00	18.00	33.00	31.00	21.00	12.00	12.00
13	29.00	37.00	19.00	40.00	32.00	19.00	9.00	14.00
14	29.00	29.00	28.00	31.00	27.00	19.00	8.00	18.00
15	35.00	34.00	28.00	43.00	29.00	30.00	11.00	18.00
16	10.00	27.00	17.00	38.00	25.00	40.00	8.00	19.00
17	10.00	29.00	18.00	41.00	19.00	29.00	10.00	16.00
18	9.00	32.00	22.00	57.00	15.00	27.00	10.00	10.00
19	19.00	35.00	17.00	47.00	17.00	36.00	12.00	10.00
20	21.00	32.00	18.00	36.00	16.00	32.00	17.00	16.00
21	28.00	18.00	26.00	33.00	21.00	23.00	11.00	19.00
22	23.00	19.00	29.00	35.00	22.00	24.00	17.00	18.00
23	20.00	26.00	30.00	25.00	24.00	29.00	29.00	22.00
24	28.00	26.00	35.00	29.00	20.00	27.00	25.00	23.00
25	21.00	23.00	40.00	34.00	26.00	18.00	21.00	19.00
26	20.00	30.00	33.00	36.00	22.00	18.00	17.00	20.00
27	27.00	17.00	26.00	27.00	19.00	21.00	19.00	14.00
28	25.00	21.00	33.00	35.00	23.00	20.00	18.00	14.00
29	30.00	20.00	30.00	35.00	28.00	31.00	21.00	18.00
30	27.00	17.00	37.00	29.00	38.00	22.00	19.00	15.00
31	38.00	17.00	41.00	21.00	31.00	21.00	10.00	15.00
32	32.00	15.00	42.00	29.00	31.00	25.00	8.00	24.00
33	30.00	18.00	32.00	34.00	18.00	30.00	13.00	9.00
34	26.00	17.00	35.00	25.00	26.00	25.00	10.00	19.00
35	28.00	18.00	36.00	22.00	33.00	25.00	17.00	15.00
36	23.00	16.00	25.00	25.00	26.00	21.00	13.00	11.00
37	12.00	14.00	22.00	29.00	40.00	19.00	10.00	12.00
38	18.00	12.00	20.00	29.00	29.00	19.00	17.00	17.00
39	17.00	17.00	25.00	30.00	27.00	29.00	10.00	13.00
40	20.00	13.00	28.00	34.00	14.00	24.00	13.00	14.00
41	16.00	18.00	25.00	30.00	23.00	65.00	20.00	15.00
42	20.00	18.00	31.00	50.00	33.00	42.00	19.00	19.00
43	18.00	17.00	19.00	40.00	30.00	45.00	19.00	23.00
44	22.00	20.00	40.00	34.00	34.00	33.00	16.00	19.00
45	20.00	18.00	35.00	30.00	27.00	31.00	20.00	20.00
46	20.00	17.00	29.00	46.00	21.00	21.00	10.00	18.00
47	28.00	16.00	29.00	31.00	29.00	32.00	8.00	24.00
48	20.00	19.00	26.00	46.00	28.00	34.00	14.00	20.00
49	22.00	17.00	27.00	29.00	28.00	29.00	18.00	0.00
50	22.00	20.00	28.00	27.00	27.00	22.00	23.00	0.00
51	12.00	16.00	66.00	22.00	19.00	23.00	19.00	18.00
52	14.00	19.00	72.00	18.00	20.00	32.00	20.00	18.00
53	18.00	18.00	51.00	18.00	18.00	37.00	12.00	17.00
54	15.00	20.00	38.00	21.00	19.00	34.00	23.00	18.00
55	21.00	18.00	34.00	24.00	15.00	35.00	15.00	17.00
56	19.00	19.00	24.00	19.00	21.00	30.00	16.00	17.00
57	18.00	16.00	16.00	19.00	21.00	31.00	20.00	15.00
58	21.00	12.00	24.00	26.00	22.00	33.00	19.00	14.00
59	14.00	16.00	16.00	18.00	13.00	22.00	14.00	9.00
60	14.00	15.00	19.00	20.00	18.00	19.00	16.00	20.00

Valores de estimativa da área do núcleo da célula do epitélio corneano ($10^2 \mu\text{m}^2$), nas regiões do limbo (L) e central (C) da córnea, número (Nº) de campos avaliados nos olhos controles (CC) medicados com água destilada e, nos tratados com mitomicina C a 0,02%. Sacrificados aos 15 dias (MMC 15d), 50 dias (MMC 50d) e aos 100 dias (MMC 100d).

ÁREA DO NÚCLEO								
	C. C.		MMC 15 d		MMC 50 d		MMC 100 d	
	L	C	L	C	L	C	L	C
1	9.00	6.00	12.00	7.00	12.00	5.00	9.00	13.00
2	10.00	8.00	14.00	10.00	14.00	7.00	18.00	17.00
3	11.00	9.00	11.00	4.00	10.00	11.00	16.00	11.00
4	11.00	9.00	13.00	9.00	8.00	10.00	9.00	16.00
5	7.00	9.00	10.00	15.00	3.00	6.00	10.00	13.00
6	8.00	12.00	0.00	10.00	5.00	8.00	24.00	12.00
7	10.00	10.00	0.00	13.00	9.00	7.00	32.00	9.00
8	10.00	10.00	0.00	9.00	9.00	7.00	23.00	5.00
9	8.00	9.00	0.00	11.00	8.00	5.00	22.00	7.00
10	9.00	9.00	0.00	12.00	6.00	6.00	32.00	7.00
11	15.00	10.00	5.00	16.00	8.00	7.00	7.00	3.00
12	14.00	19.00	10.00	11.00	4.00	7.00	6.00	5.00
13	12.00	14.00	9.00	11.00	9.00	4.00	5.00	5.00
14	9.00	9.00	9.00	13.00	12.00	6.00	3.00	6.00
15	13.00	10.00	9.00	16.00	6.00	6.00	2.00	8.00
16	5.00	8.00	5.00	12.00	5.00	6.00	5.00	10.00
17	9.00	10.00	5.00	9.00	7.00	7.00	6.00	7.00
18	6.00	11.00	8.00	11.00	8.00	9.00	3.00	6.00
19	8.00	15.00	6.00	11.00	10.00	5.00	4.00	3.00
20	8.00	9.00	6.00	9.00	4.00	12.00	8.00	6.00
21	11.00	8.00	10.00	11.00	11.00	9.00	6.00	9.00
22	9.00	5.00	11.00	6.00	8.00	8.00	6.00	7.00
23	9.00	9.00	10.00	7.00	9.00	8.00	6.00	4.00
24	9.00	4.00	10.00	11.00	8.00	6.00	9.00	5.00
25	4.00	6.00	7.00	8.00	9.00	4.00	5.00	6.00
26	10.00	7.00	10.00	6.00	6.00	5.00	8.00	6.00
27	8.00	6.00	7.00	7.00	6.00	8.00	8.00	5.00
28	9.00	10.00	10.00	6.00	6.00	8.00	5.00	4.00
29	3.00	5.00	10.00	7.00	6.00	14.00	9.00	4.00
30	6.00	7.00	10.00	6.00	14.00	4.00	7.00	3.00
31	17.00	4.00	11.00	10.00	9.00	7.00	5.00	4.00
32	14.00	4.00	8.00	8.00	9.00	6.00	5.00	4.00
33	15.00	7.00	9.00	11.00	8.00	9.00	6.00	6.00
34	6.00	9.00	5.00	6.00	10.00	11.00	7.00	10.00
35	6.00	4.00	3.00	11.00	13.00	8.00	7.00	5.00
36	10.00	4.00	11.00	6.00	8.00	9.00	7.00	4.00
37	8.00	8.00	11.00	8.00	10.00	7.00	8.00	5.00
38	4.00	5.00	12.00	8.00	13.00	6.00	10.00	9.00
39	9.00	7.00	8.00	9.00	13.00	11.00	6.00	3.00
40	6.00	4.00	6.00	13.00	6.00	8.00	6.00	7.00
41	9.00	9.00	6.00	10.00	6.00	23.00	9.00	4.00
42	9.00	3.00	5.00	13.00	5.00	13.00	12.00	10.00
43	10.00	5.00	7.00	6.00	7.00	10.00	8.00	12.00
44	9.00	3.00	10.00	5.00	8.00	11.00	8.00	12.00
45	6.00	5.00	9.00	4.00	8.00	11.00	7.00	11.00
46	8.00	6.00	2.00	10.00	8.00	6.00	7.00	10.00
47	12.00	3.00	9.00	6.00	12.00	12.00	9.00	14.00
48	4.00	6.00	10.00	14.00	5.00	11.00	8.00	12.00
49	6.00	8.00	8.00	4.00	9.00	14.00	8.00	0.00
50	8.00	9.00	6.00	5.00	10.00	7.00	10.00	0.00
51	7.00	5.00	19.00	6.00	5.00	5.00	11.00	5.00
52	6.00	7.00	18.00	7.00	7.00	7.00	12.00	2.00
53	7.00	9.00	8.00	7.00	5.00	6.00	9.00	6.00
54	6.00	6.00	7.00	6.00	11.00	8.00	12.00	4.00
55	11.00	4.00	6.00	9.00	5.00	7.00	8.00	6.00
56	4.00	5.00	11.00	3.00	6.00	6.00	4.00	3.00
57	4.00	3.00	7.00	6.00	6.00	7.00	8.00	7.00
58	7.00	5.00	9.00	6.00	7.00	9.00	10.00	6.00
59	5.00	6.00	7.00	4.00	4.00	5.00	4.00	5.00
60	6.00	5.00	6.00	9.00	2.00	7.00	5.00	8.00

Valores de estimativa da área do citoplasma da célula do epitélio corneano ($10^2 \mu\text{m}^2$), nas regiões do limbo (L) e central (C) da córnea, número (Nº) de campos avaliados nos olhos controles (CC) medicados com água destilada e, nos tratados com mitomicina C a 0,02%. Sacrificados aos 5 dias (MMC 15d), 50 dias (MMC 50d) e aos 100 dias (MMC 100d).

ÁREA DO CITOPLASMA								
	C. C.		MMC 15 d		MMC 50 d		MMC 100 d	
	L	C	L	C	L	C	L	C
1	9	20	16	32	11	17	8	28
2	8	22	15	28	16	18	12	19
3	9	21	15	34	19	21	11	22
4	11	24	20	28	20	19	13	21
5	12	19	20	23	12	18	11	22
6	12	18	0	26	14	16	39	24
7	7	18	0	25	10	19	47	26
8	7	24	0	20	11	12	26	28
9	13	18	0	21	14	17	20	25
10	16	16	0	18	14	18	31	27
11	13	28	4	35	21	18	5	5
12	14	21	8	22	27	14	6	7
13	17	23	10	29	23	15	4	9
14	20	20	19	18	15	13	5	12
15	22	24	19	27	23	24	9	10
16	5	19	12	26	20	34	3	9
17	1	19	13	32	12	22	4	9
18	3	21	14	46	7	18	7	4
19	11	20	11	36	7	31	8	7
20	13	23	12	27	12	20	9	10
21	17	10	16	22	10	14	5	10
22	14	14	18	29	14	16	11	11
23	11	17	20	18	15	21	23	18
24	19	22	25	18	12	21	16	18
25	17	17	33	26	17	14	16	13
26	10	23	23	30	16	13	9	14
27	19	11	19	20	13	13	11	9
28	16	11	23	29	17	12	13	10
29	27	15	20	28	22	17	12	14
30	21	10	27	23	24	18	12	12
31	21	13	30	11	22	14	5	11
32	18	11	34	21	22	19	3	20
33	15	11	23	23	10	21	7	3
34	20	8	30	19	16	14	3	9
35	22	14	33	11	20	17	10	10
36	13	12	14	19	18	12	6	7
37	4	6	11	21	30	12	2	7
38	14	7	8	21	16	13	7	8
39	8	10	17	21	14	18	4	10
40	14	9	22	21	8	16	7	7
41	7	9	19	20	17	42	11	11
42	11	15	26	37	28	29	7	9
43	8	12	12	34	23	35	11	11
44	13	17	30	29	26	22	8	7
45	14	13	26	26	19	20	13	9
46	12	11	27	36	13	15	3	8
47	16	13	20	25	17	20	3	10
48	16	13	16	32	23	23	6	8
49	16	9	19	25	19	15	10	0
50	14	11	22	22	17	15	13	0
51	5	11	47	16	14	18	8	13
52	8	12	54	11	13	25	8	16
53	11	9	43	11	13	31	3	11
54	9	14	31	15	8	26	11	14
55	10	14	28	15	10	28	7	11
56	15	14	13	16	15	24	12	14
57	14	13	9	13	15	24	12	8
58	14	7	15	20	15	24	9	8
59	9	10	9	14	9	17	10	4
60	8	10	13	11	16	12	11	12

ANEXO 4

QUADRO 1: Resultados obtidos pela reação imuno-histoquímica, da expressão das citoceratinas das células epiteliais corneanas de coelhos, com os anticorpos monoclonais AE₁ e AE₅, observados nos animais do grupo controle, medicados com água destilada e sacrificados com 15 dias.

DIAS	ANIMAL Nº	AE ₁		AE ₅	
		OE		OE	
		L (+)	C (-)	L (-)	C (+)
CC	15	+	-	-	+
	17	+	-	-	-----
	18	+	-	-	+
	19	+	-	-	+
	21	+	-	-	+
	22	+	-	-	-----

AE1 = ANTICORPO AE1
OE = OLHO ESQUERDO
----- = NÃO CONCLUSIVO

AE5 = ANTICORPO AE5
L = LIMBO
C = CÔRNEA

QUADRO 2: Resultados obtidos pela reação imuno-histoquímica, da expressão das citoceratinas das células epiteliais corneanas de coelhos, com os anticorpos monoclonais AE₁ e AE₅, observados nos animais tratados com mitomicina C a 0,02% e sacrificados com 15 dias.

DIAS	ANIMAL Nº	AE ₁		AE ₅	
		OE		OE	
		L (+)	C (-)	L (-)	C (+)
15	4	+	-	-	+
	7	+	-	-	+
	11	+	-	+	+
	12	+	-	-	+
	23	-----	-	-	-----
	24	-	-	-	+

AE1 = ANTICORPO AE1
OE = OLHO ESQUERDO
----- = NÃO CONCLUSIVO

AE5 = ANTICORPO AE5
L = LIMBO
C = CÔRNEA

QUADRO 3: Resultados obtidos pela reação imuno-histoquímica, da expressão das citoceratinas das células epiteliais corneanas de coelhos, com os anticorpos monoclonais AE₁ e AE₅, observados nos animais tratados com mitomicina C a 0,02% e sacrificados com 50 dias.

DIAS	ANIMAL Nº	AE ₁		AE ₅	
		OE		OE	
		L (+)	C (-)	L (-)	C (+)
50	3	+	-	-	+
	8	+	-	-	+
	9	+	-	-	+
	13	+	-	-	+
	25	+	-	-	+
	26	+	-	-	+

AE1 = ANTICORPO AE1
OE = OLHO ESQUERDO
—— = NÃO CONCLUSIVO

AE5 = ANTICORPO AE5
L = LIMBO
C = CÔRNEA

QUADRO 4: Resultados obtidos pela reação imuno-histoquímica, da expressão das citoceratinas das células epiteliais corneanas de coelhos, com os anticorpos monoclonais AE₁ e AE₅, observados nos animais tratados com mitomicina C a 0,02% e sacrificados com 100 dias.

DIAS	ANIMAL Nº	AE ₁		AE ₅	
		OE		OE	
		L (+)	C (-)	L (-)	C (+)
100	1	+	-	-	+
	5	+	-	-	+
	10	+	-	-	+
	21	+	-	-	+
	22	+	-	-	+
	14	+	-	-	+

AE1 = ANTICORPO AE1
OE = OLHO ESQUERDO
—— = NÃO CONCLUSIVO

AE5 = ANTICORPO AE5
L = LIMBO
C = CÔRNEA

QUADRO 5: Resultados obtidos pela reação imuno-histoquímica, da expressão das citoceratinas das células epiteliais corneanas de coelhos, com os anticorpos monoclonais AE₁ e AE₅, observados nos animais desepitelizados no 46º e 96º dias e sacrificados com 50 e 100 dias, previamente tratados com água destilada e mitomicina C a 0,02%.

DIAS	ANIMAL Nº	AE ₁				AE ₅			
		OD		OE		OD		OE	
		L (+)	C (-)	L (+)	C (-)	L (-)	C (+)	L (-)	C (+)
	DEFEITO EPITELIAL								
DIAS	ANIMAL Nº	OD		OE		OD		OE	
		L (+)	C (-)	L (+)	C (-)	L (-)	C (+)	L (-)	C (+)
50	6	-----	-	+	-----	-	+	-	-----
	16	+	-	+	-----	-	-----	-	+
100	2	+	-	+	-	-	+	-	+
	20	+	-	+	-	-	+	-	+

AE1 = ANTICORPO AE1
 OD = OLHO DIREITO
 L = LIMBO
 ----- = NÃO CONCLUSIVO

AE5 = ANTICORPO AE5
 OE = OLHO ESQUERDO
 C = Córnea

FIGURAS

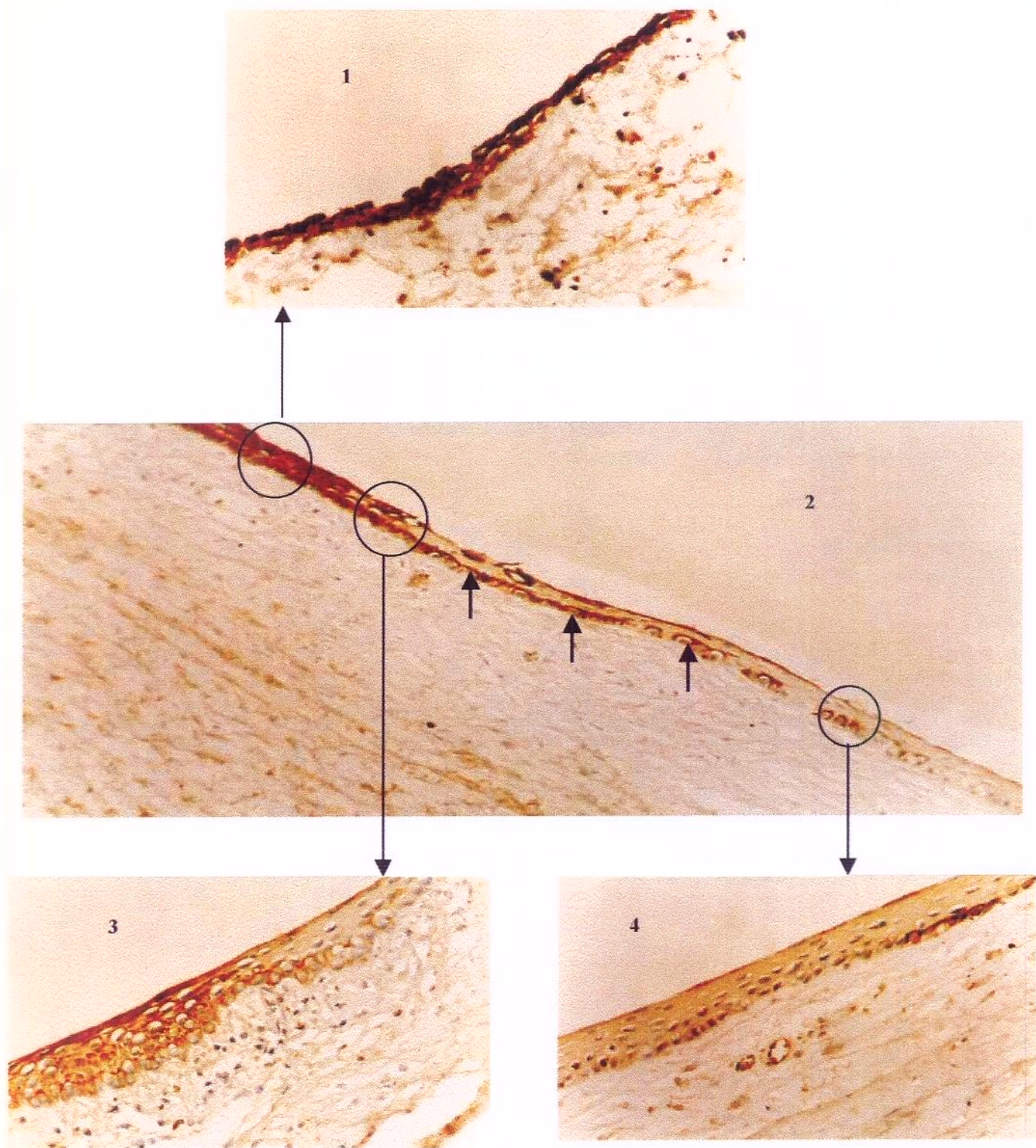


Figura 1: fotografias de cortes histológicos da reação da expressão das citoceratinas com anticorpo AE1 na região do limbo (setas)

1. Epitélio do limbo 400X coelho nº 20
2. Transição limbo -córnea 250X coelho nº 20
3. Transição limbo - córnea aumento 400X coelho nº 15
4. Córnea 400X coelho nº 20

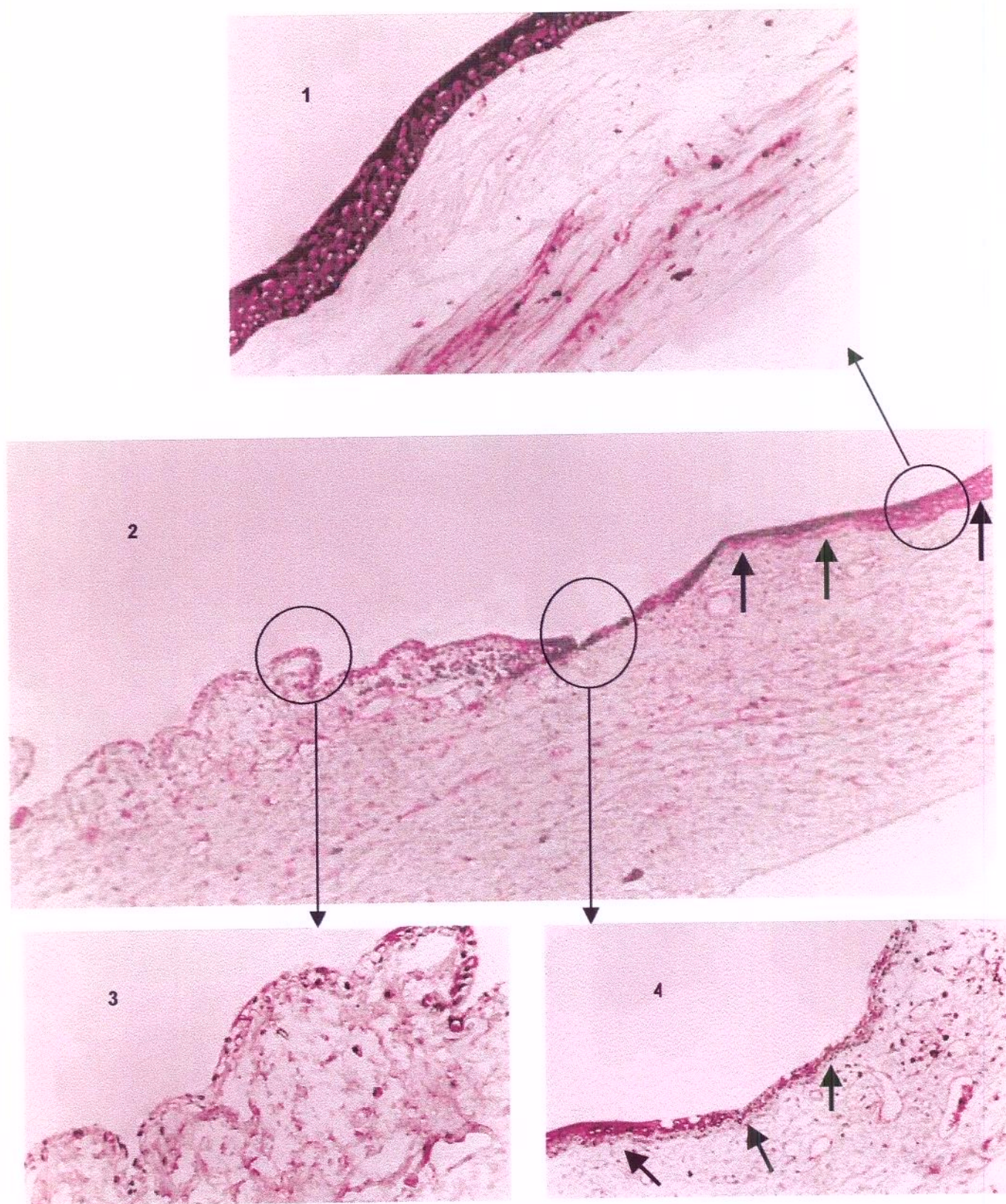


Figura 2: fotografias de cortes histológicos da reação da expressão das citoceratinas com anticorpo AE₅ na região da córnea (setas)

1. Córnea 400X, coelho nº 1
2. Transição limbo - córnea 100X, coelho nº 1
3. Limbo 400X, coelho nº 1
4. Transição limbo - córnea 250X, coelho nº 17