

MARISA BRAGA POTÉRIO

***INFLUÊNCIA DO USO TÓPICO EPISCLERAL INTRA-
OPERATÓRIO DE MITOMICINA C NA PROLIFERAÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO
DE CÉLULAS EPITELIAIS DA CÓRNEA DE COELHAS.***

CAMPINAS

2003

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

P848i Potério, Marisa Braga
Influência do uso tópico episcleral intra-operatório de mitomicina C na proliferação e diferenciação de células epiteliais da córnea de coelhas / Marisa Braga Potério. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientadores : Ana Maria Marcondes, Newton Kara José
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Antígenos - Imunologia. 2. Imunoistoquímica. 3. Conjuntiva. 4. Epitélio. 5. Animais. 6. Olhos. 7. Complicações pós-operatórias. 8. Toxicidade – testes. I. Ana Maria Marcondes. II. Newton Kara José. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

MARISA BRAGA POTÉRIO

***INFLUÊNCIA DO USO TÓPICO EPISCLERAL INTRA-
OPERATÓRIO DE MITOMICINA C NA PROLIFERAÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO
DE CÉLULAS EPITELIAIS DA CÓRNEA DE COELHAS.***

*Tese Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas, área de Oftalmologia.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANA MARIA MARCONDES

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. NEWTON KARA JOSÉ

CAMPINAS

2003

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

ORIENTADORA: Profa.-Dra. Ana Maria Marcondes

CO – ORIENTADOR: Prof.-Dr. Newton Kara José

MEMBROS:

1. Prof.-Dr. Carmo Mandia Júnior

2. Prof.-Dr. Marcos Wilson Sampaio

3. Profa.-Dra. Ana Maria Marcondes

4. Profa.-Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden

5. Prof.-Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos

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

DATA: 16/04/2003

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João e Glória,

que com seus exemplos de determinação, dedicação, positivismo influenciam a minha trajetória, e transmitem a força que preciso para alcançar meus objetivos, responsáveis pela minha formação.

Aos meus irmãos, Cláudia, Eloisa e Eduardo,

que sempre estão presentes, unidos e perseverantes em seus ideais, participando dos grandes momentos da minha vida.

Ao meu marido, Rodrigo,

a quem amo, agradeço pela compreensão, sempre dedicado em me fazer cada dia mais feliz.

À minha família,

agradeço o apoio e a força dedicados, me transmitindo a tranquilidade nos momentos mais difíceis, a integridade e a união que fazem parte da minha vida.

À Profa.-Dra. Ana Maria Marcondes,

que sempre me incentivou a acreditar que é possível, exemplo de dedicação à tarefa de educar e formar, além de pessoa valiosa e amiga.

Ao Prof.-Dr. Newton Kara José,

pessoa admirável, exemplo de perseverança e objetividade responsável pela minha formação profissional no exercício da Oftalmologia, foi o grande incentivador da minha iniciação científica.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar energia e iluminar meus passos;

Ao Prof.-Dr. Milton Ruis Alves, Professor Livre-Docente da Faculdade de Medicina da USP, exemplar e impecável no exercício da Oftalmologia e da pesquisa científica, pela preciosa orientação e dedicação durante a confecção deste estudo.

Ao Dr. Jonh Timothy Stout, PhD, professor da University of Southern California e chefe do Departamento de Oftalmologia do Children's Hospital de Los Angeles - CA, pelo apoio técnico-científico imprescindível para meu ingresso na pós-graduação e minha iniciação científica.

Ao Prof.-Dr. José Antônio Rocha Gontijo, do Departamento de Clínica Médica, pela atenção, confiança, incentivo e apoio oferecidos durante o período de desenvolvimento deste estudo.

À Prof.-Dra. Ester Maria Daniele Nicola, do Departamento de Oftalmologia / Otorrinolaringologia, pela amizade e por ceder o laboratório da Otorrinolaringologia para os procedimentos cirúrgicos.

À Prof.-Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden, do Departamento de Anatomia Patológica, pela dedicação e atenção recebida para que as leituras das lâminas fossem realizadas.

Ao Prof.-Dr. José Francisco Figueiredo, coordenador do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, pela confiança e apoio no desenvolvimento da fase experimental desse projeto.

Aos amigos Erasmo Gomes Carrasco, Ana Cristina de Moraes, William Adalberto da Silva, Waldemir Benedito Costa e Miguel Luis

Cândido, integrantes do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, pelo imenso auxílio durante os procedimentos cirúrgicos e cuidados com os animais.

Ao Prof.-Dr. Konradin Metzen, do Departamento de Anatomia Patológica pela permissão em utilizar o laboratório do Departamento de Anatomia Patológica, no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental para confecção dos blocos e das lâminas.

Ao Sr. Sérgio Paulo de Magalhães, técnico do Laboratório de Anatomia Patológica, pela confecção dos blocos e processamento das lâminas.

Ao Prof.- Dr. José Vassalo, Professor Livre-Docente do Departamento de Anatomia Patológica da FCM – UNICAMP, pela dedicação e permissão em utilizar o laboratório para a confecção das lâminas direcionadas à análise da diferenciação celular.

À Biomédica Glauce Aparecida Pinto, responsável pelo Laboratório de Imunoistoquímica e Hibridação do CAISM, pela orientação na confecção das lâminas.

Ao Biólogo Cristiano Aparecido Chagas, pela dedicação e confecção das lâminas de imunoistoquímica e manipulação do BrdU, colírios e MMC.

Ao Prof.- Dr. José Butori Lopes de Faria, Chefe do Laboratório de Nefrologia da FCM – UNICAMP, por ceder o Laboratório para a confecção das lâminas dedicadas ao estudo da proliferação celular.

À Técnica Lilia Aikawa Silveira, pela amizade e dedicação despendida em me ensinar a trabalhar com os reagentes, para confecção das lâminas.

À Profa.-Dra. Glória Maria Braga Potério, grande amiga, mãe, responsável pelas críticas e correções relacionadas ao desenvolvimento do texto desta tese.

Ao Prof.-Dr. Carlos Leite Arieta, do Departamento de Oftalmologia, e integrante do Curso de Pós-Graduação da FCM – UNICAMP, pelo incentivo, apoio e orientação para finalização deste estudo.

À Profa.-Dra. Edmeia R. Temporini Nastari, do Departamento de Oftalmologia e integrante do Curso de Pós-Graduação da FCM – UNICAMP, pela disposição e atenção dedicadas à correção inicial do texto da tese.

Aos estaticistas, Rossana Verônica Mendoza López, Rogério Novaes Santucci e Sirlei Siani, pelos valiosos cálculos estatísticos, atenção e dedicação durante a fase final deste estudo.

À Antônia Cecília Campos, secretária do Núcleo de Prevenção de Cegueira, amiga, sempre pronta a ajudar.

À Ana Rita de Oliveira Gonçalves, Valtuir Celleri Nunes e Sueli Aparecida dos Santos D’Hora, integrantes da Secretaria de Oftalmologia / Otorrinolaringologia da FCM – UNICAMP, pelo auxílio e orientação para finalizar a documentação necessária para apresentação deste estudo.

Aos amigos professores, residentes e funcionários do Departamento de Oftalmologia / Otorrinolaringologia da FCM – UNICAMP, e a todos que direta ou indiretamente participaram deste estudo.

*“Quando se acredita que é possível,
se consegue o mundo...”*

Marisa Braga Potério

SUMÁRIO

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>xliv</i>
.....	
ABSTRACT	<i>xlix</i>
.....	
1-	53
INTRODUÇÃO	
.....	
1.1- Justificativa.....	55
1.2- mitomicina.....	A 56
1.2.1- O uso sistêmico da MMC.....	58
1.2.2- O uso de MMC em procedimentos oftalmológicos.....	59
1.2.3- Complicações relacionadas ao uso de MMC.....	61
1.2.4- O epitélio da córnea de humanos.....	63
1.2.5- O epitélio de córnea de coelhos.....	66
1.2.6- Marcadores de proliferação e diferenciação celular.....	68
1.2.7- Método.....	70

experimental.....		
2-		73
OBJETIVOS.....		
.....		
2.1- Objetivo		75
Geral.....		
2.2- Objetivos		75
Específicos.....		
3- MATERIAL E		77
MÉTODOS.....		
3.1-		79
Experimentos.....		
3.1.1- Aspectos		79
Éticos.....		
3.2- Drogas e soluções		79
utilizadas.....		
3.2.1- Preparo das		81
soluções.....		
3.2.1.1- Mitomicina		81
C.....		

3.2.1.2- Solução de 5-bromo-2-deoxiuridine (BrdU).....	81
3.2.1.3- Álcool etílico a 95%.....	81
3.2.1.4- Diaminobenzidina (DAB).....	81
3.2.2- Preparo dos anticorpos.....	81
3.3- Animais.....	82
3.3.1- Identificação dos animais.....	82
3.4- Delineamento experimental.....	82
3.5- Formação dos lotes de animais.....	83
3.6- Procedimentos realizados em animais.....	85
3.6.1- Experimentos realizados com desepitelização parcial da córnea antes da aplicação da solução.....	85
3.6.2- Experimento realizado com desepitelização parcial da córnea após a aplicação da solução.....	87
3.6.3- Avaliação tardia dos efeitos da MMC sob a proliferação e diferenciação celular.....	88

3.7-	Cuidados	pós-	90
operatórios.....			
3.8-	Aplicação	do	reagente
BrdU.....			91
3.9-	Sacrifício	dos	91
animais.....			
3.10-	Retirada	dos	tecidos
laboratorial.....			para análise
			91
3.11-	Processamento	das	92
lâminas.....			
3.12-		Processamento	92
imunoistoquímico.....			
3.12.1-	Anticorpos	primários	–
AE5.....			AE1/ AE3 e
			92
3.12.2-	O	reagente	93
BrdU.....			

3.13- Análise do padrão de diferenciação do epitélio da córnea – imunoistoquímica.....	94
.....	
3.14- Análise das lâminas coradas com o BrdU.....	95
3.15- Tratamento estatístico.....	96
4-	97
RESULTADOS	
.....	
4.1- Análise macroscópica.....	99
4.2- Análise imunoistoquímica.....	99
4.2.1. Reagentes AE1 / AE3.....	99
4.2.2.- Reagentes AE5.....	101
4.2.3- Reagente BrdU.....	103
5-	113
DISCUSSÃO	
.....	
6-	125
CONCLUSÕES	
.....	
7- REFERÊNCIAS	129

BIBLIOGRÁFICAS.....

8- 145

ANEXOS.....

.....

Anexo 1- Statement for the use of animals in ophthalmic and visual
research..... 147

.....

Anexo 2- Resolução 149
592/ 1992.....

Anexo 3- Resultados das contagens de células coradas com BrdU,
obtidas nos 3 campos de cada região (nasal, central e
temporal) nos animais do lote A (sacrifício em 4 dias) que
receberam SF (solução fisiológica 151
0,9%).....

.....

Anexo 4- Resultados das contagens de células coradas com BrdU,
obtidas nos 3 campos de cada região (nasal, central e
temporal) nos animais do lote A (sacrifício em 4 dias) que
receberam mitomicina C..... 153

Anexo 5- Resultados das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região (nasal, central e temporal) nos animais do lote B (sacrifício em 15 dias) que receberam SF (solução fisiológica 0,9%).....	155
.....	
Anexo 6- Resultados das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região (nasal, central e temporal) nos animais do lote B (sacrifício em 15 dias) que receberam mitomicina C.....	157
Anexo 7- Resultados das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região (nasal, central e temporal) nos animais do lote C (sacrifício em 45 dias) que receberam SF (solução fisiológica 0,9%).....	159
.....	
Anexo 8- Resultados das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região (nasal, central e temporal) nos animais do lote C (sacrifício em 45 dias) que receberam mitomicina C.....	161
Anexo 9-	163
Figuras.....	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*	- probabilidade de erro menor ou igual a 5 por cento
μ	- micra
μl	- microlitro
° C	- graus Celsius
AE1	- referente ao antígeno e anticorpo AE1
AE3	- referente ao antígeno e anticorpo AE3
AE5	- referente ao antígeno e anticorpo AE5
ABC	- complexo avidina-biotina
ARVO	- Association for Research in Vision and Ophthalmology
BrdU	- bromodeoxiuridina
BSA	- soro albumina bovina
CA	- Califórnia - EUA
CAISM	- Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAB	- diaminobenzidina
DI50	- dose inibitória de 50%
DMSO	- Dimethyl Sulfoxite
DNA	- ácido desoxirribonucléico

FCM	- Faculdade de Ciências Médicas
g	- grama
G0	- fase não proliferativa
G1	- fase pré-sintética
G2	- fase pós-sintética
H₂O₂	- água oxigenada
HCL	- ácido clorídrico
hs	- horas
kd	- kilodaltons
ltda.	- limitada
M	- mitose
mg/ml	- miligrama por mililitro
mg/kg	- miligrama por kilo
ml	- mililitro
mm	- milímetro
mM	- milimol
MMC	- mitomicina C
mOsm/l	- miliosmol/ litro
N	- normal

Nh₄OH	- água amoniacal
PBS	- solução salina tamponada com fosfatos (Phosphate Buffered Saline)
pH	- potencial hidrogeniônico
PO	- pós-operatório
RNA	- ácido ribonucléico
RNA_m	- ácido ribonucléico mensageiro
S	- síntese
S.A.	- Sociedade Anônima
SP	- São Paulo
UNICAMP	- Universidade Estadual de Campinas
X	- vezes de aumento

	PÁG.
Tabela 1- Resultados da análise imunoistoquímica, da expressão de ceratinas de células epiteliais de córneas de coelhos, dos 3 lotes, com os anticorpos AE1/ AE3, distribuídos de acordo com a técnica de cirúrgica (desepitelização parcial prévia = desepitelização da córnea antes da aplicação da solução; desepitelização parcial após = desepitelização da córnea após a aplicação da solução) e da solução sorteada (SF; MMC).....	100
Tabela 2- Resultados da análise imunoistoquímica, da expressão de ceratinas de células epiteliais de córneas de coelhos, dos 3 lotes, com o anticorpo AE5, distribuídos de acordo com a técnica de cirúrgica (desepitelização parcial prévia = desepitelização da córnea; antes da aplicação da solução; desepitelização parcial após = desepitelização da córnea após a aplicação da solução) e da solução sorteada (SF; MMC).....	102
Tabela 3- Valores mínimos, máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região da córnea, nos animais do lote A, nos quais a solução empregada após desepitelização da região demarcada da córnea (desepitelização parcial prévia) foi o soro fisiológico.....	103
Tabela 4- Valores mínimos, máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região da córnea nos animais do lote A, nos quais a desepitelização parcial da córnea foi realizada após aplicação do soro fisiológico.....	104

Tabela 5-	Valores mínimos, máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote A, nos quais a mitomicina C foi aplicada após desepitelização da região demarcada da córnea (desepitelização parcial prévia).....	104
Tabela 6-	Valores mínimos, máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote A, nos quais a desepitelização parcial da córnea foi realizada após aplicação da MMC.....	105
Tabela 7-	Valores mínimos, máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote B, nos quais a solução empregada após desepitelização da região demarcada da córnea (desepitelização parcial prévia) foi o soro fisiológico.....	105
Tabela 8-	Valores mínimos, máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote B, nos quais a desepitelização parcial da córnea foi realizada após aplicação do soro fisiológico.....	106
Tabela 9-	Valores mínimos, máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote B, nos quais a mitomicina C foi aplicada após desepitelização da região demarcada da córnea (desepitelização parcial prévia).....	106
Tabela	Valores mínimos, máximos, medianas, médias e desvios-padrão	

10 -	das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote B., nos quais a desepitelização parcial da córnea foi realizada após aplicação da MMC.....	107
-------------	---	-----

Tabela 11-	Valores mínimos, máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote C, nos quais a solução empregada após a desepitelização da região demarcada da córnea (desepitelização parcial prévia) foi o soro fisiológico.....	107
Tabela 12-	Valores mínimos, máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote C, nos quais a desepitelização parcial da córnea foi realizada após aplicação do soro fisiológico.....	108
Tabela 13-	Valores mínimos, máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote C, nos quais a mitomicina C foi aplicada após desepitelização da região demarcada da córnea (desepitelização parcial prévia).....	108
Tabela 14-	Valores mínimos, máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote C, nos quais a desepitelização parcial da córnea foi realizada após aplicação da MMC.....	109
Tabela 15-	Modelo fatorial para análise estatística considerando como fatores: drogas utilizadas (MMC e SF) e lotes (A, B e C). Estudo considerando a proliferação celular em toda a córnea e em cada região específica após a técnica de desepitelização parcial prévia = desepitelização parcial da córnea antes da aplicação da	110

solução.

Tabela	Modelo fatorial para análise estatística considerando como	
16 -	fatores: drogas utilizadas (MMC e SF) e lotes (A, B e C). Estudo	
	considerando a proliferação celular em toda a córnea e em cada	
	região específica, na técnica de desepitelização parcial da córnea	
	após a aplicação da	111
	solução.....	

LISTA DE FIGURAS

	<i>PÁG.</i>
Figura 1- Fórmula estrutural da MMC.....	57
Figura 2- Representação esquemática da técnica cirúrgica de desepitelização parcial prévia.....	86
Figura 3- Representação esquemática da técnica cirúrgica de desepitelização parcial da córnea após a aplicação da solução.....	88
Figura 4- Representação esquemática da aplicação do marcador de zona óptica de 8,0mm de diâmetro, em região central da córnea do coelho. A região demarcada abrange a área da córnea que foi desepitelizada 3 dias antes do sacrifício dos animais do lote C.....	89
Figura 5- Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote A. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (AE1/ AE3, 400X).....	163
Figura 6- Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote B. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (AE1/ AE3, 400X).....	163

- Figura 7-** Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote C. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (AE1/ AE3, 400X)..... 164
- Figura 8-** Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea controle negativo para os anticorpos primários AE1/ AE3. Nota-se ausência de células marcadas. (400X)..... 164

Figura 9-	Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote A. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (AE5, 400X).....	165
Figura 10 -	Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote B. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (AE5, 400X).....	165
Figura 11-	Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote C. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (AE5, 400X).....	166
Figura 12-	Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea controle negativo para os anticorpos primários AE5. Nota-se ausência de células marcadas. (400X).....	166
Figura 13-	Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote A. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (BrdU, 400X).....	167

Figura 14-	Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote B. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (BrdU, 400X).....	167
Figura 15-	Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote C. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (BrdU, 400X).....	168
Figura 16-	Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea controle negativo para os anticorpos primários BrdU. Nota-se ausência de células marcadas. (400X).....	168

LISTA DE QUADROS

		<i>PÁG.</i>
Quadro	Fluxograma dos experimentos com os animais dos lotes – A e	84
1-	B.....	
Quadro	Fluxograma dos experimentos com os animais do lote –	84
2-	C.....	



RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da mitomicina C (MMC) a 0,02%, aplicada em dose única por 3 minutos, na proliferação e diferenciação das células do epitélio da córnea de coelhas.

Durante o procedimento cirúrgico aplicou-se MMC ou soro fisiológico (SF) sendo a droga a ser utilizada em cada animal (nos 2 olhos) definida por sorteio. A solução sorteada foi aplicada topicamente na episclera da região limbar temporal, com o tecido epitelial da córnea íntegro (em um olho) e após a desepitelização parcial (no olho contra-lateral). Os animais foram distribuídos em lotes A (20 olhos), B (16 olhos) e C (14 olhos) e sacrificados respectivamente no 4º, 15º e 45º dia de experimento. Para estimular a proliferação celular, os animais do lote C foram submetidos à desepitelização da córnea central 3 dias antes do dia do sacrifício.

Para o estudo da diferenciação do epitélio da córnea empregou-se anticorpos monoclonais (AE-1, AE-3 e AE-5). Para a análise da proliferação celular utilizou-se solução de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU), aplicada via endovenosa em todos os animais, 24 horas antes do sacrifício. Nas lâminas preparadas para o estudo com BrdU, sob microscopia óptica foram definidas as porções temporal, nasal e central da córnea. Em cada porção contou-se, o número de células com expressão positiva deste marcador, em 3 campos aleatórios, definidos com objetiva milimetrada. A média aritmética dos 3 campos foi utilizada para análise estatística.

Os resultados das médias e desvios-padrão do número de células marcadas pela BrdU nos lotes A, B e C utilizando-se a técnica de desepitelização parcial prévia da córnea e solução fisiológica, nas regiões temporal, central e nasal foram respectivamente de $15,07 \pm 12,18$; $5,53 \pm 5,11$; $1,80 \pm 2,37$ no lote A, $11,17 \pm 11,15$; $8,50 \pm 7,18$; $9,67 \pm 9,09$ no lote B e $12,34 \pm 9,02$; $15,67 \pm 5,84$; $3,78 \pm 2,80$ no lote C. Com a mesma técnica cirúrgica usando-se a MMC, foram respectivamente: $6,60 \pm 5,33$; $3,80 \pm 6,36$ e $1,93 \pm 2,14$ no lote A, $3,09 \pm 2,40$; $4,34 \pm 2,97$ e $2,59 \pm 0,63$ no lote B e $5,83 \pm 8,55$; $6,17 \pm 1,55$; $4,42 \pm 2,63$ no lote C. Para a técnica de desepitelização parcial da córnea após a

aplicação de solução fisiológica as médias foram respectivamente: $13,80 \pm 8,51$; $7,47 \pm 3,79$; $3,07 \pm 1,55$ no lote A, $5,67 \pm 4,49$; $4,75 \pm 2,13$; $3,84 \pm 3,45$ no lote B e $6,78 \pm 3,35$; $11,67 \pm 2,97$; $3,78 \pm 1,39$ no lote C. Quando foi aplicado MMC e utilizada a técnica de desepitelização parcial da córnea após a aplicação de solução, $8,73 \pm 7,35$; $7,60 \pm 6,88$; $3,27 \pm 1,85$ no lote A, $1,75 \pm 0,78$; $3,92 \pm 3,06$; $2,67 \pm 1,98$ no lote B e $2,83 \pm 3,54$; $2,50 \pm 2,08$; $8,75 \pm 9,62$ no lote C. As diferenças entre MMC e SF foram significativas nos animais dos lotes A, B e C, nas áreas central e temporal das córneas estudadas quando a técnica de desepitelização parcial prévia foi aplicada. Não houve diferença entre as drogas quando se utilizou a técnica de desepitelização parcial da córnea após a aplicação de solução. Nas lâminas coradas com o AE1/AE3 e AE5 não houve interferência na diferenciação celular independentemente da droga ou da técnica. Esses resultados sugerem que a MMC a 0,02% em aplicação única episcleral por 3 minutos atua restritamente no local onde as células foram expostas e tem um efeito prolongado sobre a proliferação celular, na técnica de desepitelização parcial prévia.



ABSTRACT

This study was performed to evaluate the influence of 0,02% mitomycin C (MMC), applied on a single dose for 3 minutes, in proliferation and differentiation of the cornea rabbits epithelium cells. During the surgery procedure, MMC or 0,9% physiologic saline solution (SF) was applied and the solution for each animal (both eyes) was performed by raffle. A topic solution was applied at episclera of the temporal limbic area, with intact epithelial tissue (one eye) and after partial corneal desepithelization (other eye). The animals were arranged in a group A (20 eyes), group B (16 eyes) and group C (14 eyes). They were sacrificed respectively at 4th , 15th and 45th days of the post-operative. To stimulate cell proliferation, the animals of group C were submitted to central corneal desepithelization 3 days before the sacrifice day.

Cellular differentiation markers (AE1, AE3 and AE5) were used for differentiation study of the corneal epithelium. A cellular proliferation marker 5-Bromo-2-Deoxyuridine (BrdU) was applied by intravenous injection in all of the animals, 24hs before the sacrifice.

In the slides labeled with BrdU technique, the nasal, temporal and central areas were determined under optic microscopy. The number of labeled cells was counted in 3 different fields of each area using millimeter lenses. The arithmetic means of the 3 different fields was used for statistical analysis.

The mean and standard deviation of the number of labeled cells with BrdU marker in A, B and C groups using previous partial corneal desepithelization technique and SF at temporal, central and nasal area were respectively 15.07 ± 12.18 ; 5.53 ± 5.11 ; 1.80 ± 2.37 in group A, 11.17 ± 11.15 ; 8.50 ± 7.18 ; 9.67 ± 9.09 in group B e 12.34 ± 9.02 ; 15.67 ± 5.84 ; 3.78 ± 2.80 in group C. Using the same technique and MMC the results were: 6.60 ± 5.33 ; 3.80 ± 6.36 e 1.93 ± 2.14 in group A, 3.09 ± 2.40 ; 4.34 ± 2.97 e 2.59 ± 0.63 in group B e 5.83 ± 8.55 ; 6.17 ± 1.55 ; 4.42 ± 2.63 in group C. For the corneal desepithelization surgical technique after SF application, the results were: 13.80 ± 8.51 ; 7.47 ± 3.79 ;

3.07 ± 1.55 in group A, 5.67 ± 4.49 ; 4.75 ± 2.13 ; 3.84 ± 3.45 in group B e 6.78 ± 3.35 ; 11.67 ± 2.97 ; 3.78 ± 1.39 in group C. When MMC was applied in the same surgical technique, the results were: 8.73 ± 7.35 ; 7.60 ± 6.88 ; 3.27 ± 1.85 in group A, 1.75 ± 0.78 ; 3.92 ± 3.06 ; 2.67 ± 1.98 in group B e 2.83 ± 3.54 ; 2.50 ± 2.08 ; 8.75 ± 9.62 in group C. The difference between MMC and SF were statistically significant at central and temporal areas when previous partial corneal desepithelization was performed in all groups. There was no difference between drugs when corneal desepithelization technique was used after solution application.

There was no difference between differentiation cells in the slides labeled with AE1, AE3 and AE5 when drugs or surgical technique were analysed.

These results suggests that 0,02% MMC applied for 3 minutes at the episclera, acts only at the exposed cells and have late effect under the cell proliferation, when the previous partial desepithelization surgery was applied.

1- INTRODUÇÃO

1.1- JUSTIFICATIVA

A mitomicina C (MMC) é um antibiótico isolado do *Streptomyces caespitosus*, antineoplásico, que inibe seletivamente a síntese de DNA, de RNA e a síntese protéica em células de crescimento rápido. Como os demais agentes alquilantes, forma ligações covalentes com os resíduos de guanina do DNA. Sua ação é semelhante à radiação ionizante e pode apresentar efeitos cumulativos cuja duração permanece por longo tempo após cessado o tratamento (CHABNER et al., 1996; JAMPEL, 1992). Por ser um inibidor potente da proliferação fibroblástica, a MMC é eficaz na prevenção de recidivas após as ressecções de pterígio e neoplasias, proporcionando maior número de casos bem sucedidos (ALVES et al., 1995).

Estudos direcionados à avaliação da eficácia do tratamento cirúrgico do pterígio mostraram que a frequência de complicações é relativamente alta quando a técnica de esclera exposta para a ressecção do pterígio é utilizada. Com esta técnica a esclera fica exposta, após a aplicação da MMC naquela região (SINGH, 1989; PENNA, 1993, CARDILLO et al., 1995a). Em função deste dado, que pode representar um fator de risco para o aumento dos índices de complicações relacionados ao uso da MMC e na tentativa de diminuir esses índices, POTÉRIO et al. (1998) desenvolveram uma técnica cirúrgica na qual a remoção da cabeça do pterígio na porção da córnea somente é efetuada após a aplicação da MMC na região escleral.

As complicações decorrentes do uso da MMC no pós-operatório de cirurgias oftálmicas podem estar associadas a fatores droga-relacionados (KUNITOMO e MORI, 1963; SINGH et al., 1988; RUBINFELD et al., 1992), fazendo com que a segurança do uso de MMC permaneça em constante avaliação (SUGAR, 1992; CARDILLO et al., 1995a; CARDILLO et al., 1995b).

A avaliação laboratorial da diferenciação de células epiteliais da córnea tornou-se viável a partir da padronização de técnicas de análise imunoistoquímica, e o desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos. Dentre eles destacam-se o AE-1, AE3 e o AE-5, que são capazes de reconhecer, respectivamente, o grupo

de ceratinas de 40 – 56kd, de 52 – 67kd e a ceratina 64kd, sendo esta última específica das células epiteliais da córnea de coelhos (TSAI et al, 1990). Mais recentemente, a bromodeoxiuridina (BrdU) foi incluída como um reagente útil na avaliação da proliferação celular e que apresenta como principal vantagem a possibilidade de se quantificar as células da córnea e do epitélio de tecidos adjacentes (REN et al., 1999).

Considerando o risco de complicações que dependem da forma de aplicação, da concentração da droga e da duração do uso da MMC, impõe-se intensificar a avaliação do potencial iatrogênico de danos causados nas células germinativas límbicas da córnea. Considerando também a eficácia dos anticorpos específicos na avaliação da proliferação celular, justifica-se a realização de pesquisas que permitam identificar técnicas de aplicação da MMC mais seguras em relação à inibição celular.

Neste estudo adotou-se um modelo experimental que utiliza córnea de coelhas, permitindo avaliar a ação da MMC tópica, na concentração de 0,02% e possíveis alterações na proliferação e diferenciação de células epiteliais após a aplicação da droga com o tecido da córnea ainda íntegro ou imediatamente após a desepitelização do mesmo.

1.2- A MITOMICINA

As mitomicinas A e B foram extraídas do *Streptomyces caespitosus* em estudos realizados no Japão (HATA et al., 1956). Em 1958, WAKAKI et al. isolaram a mitomicina C (MMC) da fermentação do caldo de cultura do mesmo microorganismo. Estes autores descreveram que a MMC, no processo de cultura diferencia-se das demais pelas suas características de absorção da luz ultravioleta, solubilidade em solventes orgânicos, de forte estabilidade a temperaturas elevadas e pelo comportamento eletroforético.

Na forma de cristais, de coloração azul-violeta, a MMC é estável por 4 horas, a 100°C, sem perda de atividade. É uma droga solúvel em água e em solventes orgânicos, formando uma solução cinza-azulada que é inativada pela luz

visível. Dissolvida em água destilada nas concentrações de 0,1mg/ml, 0,2mg/ml, 0,5mg/ml ou a 0,4mg/ml, pode apresentar pH entre 6 e 8, e é estável por 14 dias em temperaturas de 2 a 8°C (WAKAKI et al., 1958). Nesta forma é utilizada em procedimentos clínicos e cirúrgicos, na área médica.

A partir da década de 70, o uso clínico da MMC tornou-se rotineiro. Por ser potente inibidor da proliferação celular, foi utilizada no tratamento de diferentes tipos de neoplasias, como corioepitelioma, sarcoma de células reticulares, seminoma, tumores epiteliais, carcinomas de células da cavidade bucal, pulmão, intestino e estômago (SZYBALSKI e IYER, 1967). É utilizada, também, como um antibiótico eficaz contra bactérias gram (+) e gram (-), bacilos, riquetsias e vírus (CROOKE e BRADNER, 1976).

A estrutura química da MMC apresenta um grupo aziridina, um grupo quinona e um anel mitosano, que participam nas reações de alquilação com o DNA. O grupo quinona é essencial para a atividade antineoplásica (figura 1).

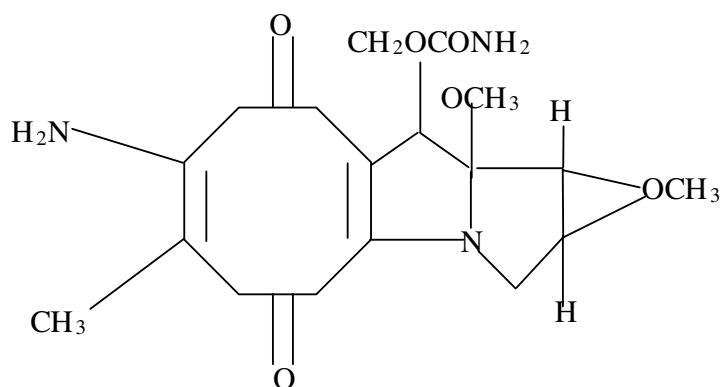


Figura 1 – Fórmula estrutural da MMC

A droga atua por reação de alquilação biorredutora e pode ser seletivamente tóxica para as células hipóxicas (CROOKE e BRADNER, 1976;

KENNEDY et al., 1980; CALABRESI e PARKS Jr., 1987). Após redução enzimática intracelular ou química, espontânea, da quinona e perda do grupo metóxi, a MMC torna-se um agente alquilante bifuncional ou trifuncional. Desta forma, inibe a síntese de DNA, ao degradar o DNA pré-formado, provoca a quebra monofilamentar do DNA e dos cromossomos, inibe a síntese de RNA (CROOKE e BRADNER, 1976; CALABRESI e PARKS Jr., 1987; CHABNER et al., 1996) e tem efeito direto nos cromossomos, produzindo alterações e aberrações (NOWELL, 1964). Em concentrações maiores (30 a 100 vezes maior que a necessária para a quebra da síntese de DNA), é capaz de causar a lise do núcleo celular (CROOKE e BRADNER, 1976; CALABRESI e PARKS Jr., 1987).

1.2.1- O uso sistêmico da MMC

Os efeitos quimioterápicos e citotóxicos estão diretamente relacionados com os efeitos alquilantes do DNA. O átomo de nitrogênio, da guanina, é particularmente susceptível à formação de um laço covalente, tanto com os agentes alquilantes monofuncionais quanto com os bifuncionais, e pode representar o alvo-chave, que determina os efeitos biológicos destes agentes. A citotoxicidade dos alquiladores bifuncionais está correlacionada com as ligações cruzadas entre os filamentos do DNA (CHABNER et al., 1996).

Como os agentes citotóxicos atuam em fases específicas do ciclo celular e têm atividade nas células que estão em processo de divisão, a compreensão da cinética do ciclo celular, para o uso apropriado da atual geração de drogas antineoplásicas (CALABRESI e PARKS Jr., 1996) é essencial. Estes agentes atuam nas neoplasias malignas, caracterizadas por crescimento rápido, ou seja, que apresentam alta percentagem de células em processo de divisão, enquanto os tumores de crescimento lento não respondem às drogas citotóxicas.

O processo de divisão celular é caracterizado por três fases: fase pré-sintética (G1), fase de síntese do DNA (S) e fase pós-sintética (G2). A fase G2 é o intervalo após o término da síntese de DNA e a mitose (M). Cada célula passa

diretamente para um novo ciclo de divisão celular, ou permanece em período não proliferativo (G0) (CALABRESI e PARKS Jr., 1996).

A maioria das drogas antineoplásicas atua especificamente nos processos de síntese de DNA, transcrição ou funcionamento do fuso mitótico, e estas drogas, portanto, são consideradas específicas do ciclo de divisão (CROOKE e BRADNER, 1976).

A administração de MMC poderá ser realizada em qualquer fase do ciclo celular. A inibição da síntese de DNA e diminuição do número de mitoses ocorrerão principalmente nas células em fase final de G1 e inicial de S (CROOKE e BRADNER, 1976).

A MMC pode inibir também a proliferação de fibroblastos, em cultura de tecidos de animais e seres humanos (LEE et al., 1990; YAMAMOTO et al., 1990; CHEW et al., 1992; JAMPEL, 1992; WOO et al., 1997; PINILLA et al., 1998), sendo o seu efeito, dose dependente. As células que não estão sintetizando DNA podem ser afetadas pela MMC e não proliferar após a exposição (JAMPEL, 1992; KHAW et al., 1992; KHAW et al., 1993).

1.2.2- O uso da MMC em procedimentos oftalmológicos

O uso da MMC tópica, na prevenção de recidivas após cirurgias para ressecção de pterígio, foi iniciado no Japão por KUNITOMO e MORI (1963), e sua popularização nos Estados Unidos se deve a SINGH et al. (1988). Os índices de recidivas no pós-operatório de ressecção de pterígio sem a utilização de uma terapia coadjuvante variam de 24% a 89%, em média de 30%, justificando os inúmeros estudos que preconizam o uso associado de drogas antiproliferativas após, ou durante a cirurgia (SUGAR, 1992; CHEN et al., 1995, CARDILLO et al., 1995b; CARDILLO et al., 1995c; CARDILLO et al., 1995d).

O uso tópico da droga no período intra-operatório, e sua utilização como colírio no pós-operatório, foi comparado nas concentrações de 0,2mg/ml e 0,4mg/ml. Tanto a forma de aplicação como as diferentes concentrações da droga contribuíram para diminuir o índice de recidivas do pterígio, de uma média de 30% para 7% (CARDILLO et al., 1995a).

A aplicação subconjuntival de 0,1 ml de MMC a 0,02%, no corpo do pterígio, três semanas antes da cirurgia, apresentou efetividade semelhante à

aplicação intra-operatória, diminuiu a frequência de recidivas no pós-operatório e a toxicidade epitelial da droga (ALVES et al., 2003).

A MMC diluída em água destilada, na concentração de 0,02mg/ml, com esponja estéril de 5 × 5mm, aplicada sobre a esclera exposta por 3 minutos, nas cirurgias para ressecção de pterígio, diminuiu a taxa de recidivas observadas no pós-operatório e a toxicidade corneoescleral (PANDA et al., 1998).

A MMC também é largamente utilizada em cirurgias fistulizantes anti-glaucomatosas (PALMER, 1991; KHOURY et al., 1998; ROBIN et al, 1997). CHEN (1983) foi o pioneiro, utilizando a MMC em dose única intra-operatória durante 5 minutos. Este método possui muitos adeptos por apresentar facilidade na aplicação, ausência de toxicidade da córnea e a melhora ao longo prazo do controle da pressão intra-ocular. Em 1996, COSTA e colaboradores observaram que baixas doses de MMC pode ser uma alternativa para o tratamento de olhos com glaucoma avançado que requerem pressões intra-oculares finais em níveis mais baixos.

Recentemente, o uso tópico da MMC constitui uma nova opção terapêutica no tratamento de neoplasias intra-epiteliais da córnea, da conjuntiva e de melanose conjuntival primária adquirida com atipia, contrapondo-se ao tratamento cirúrgico. (FINGER e Mc CORNICK, 1994; FRUCH-PERY e ROZENMAN, 1994; FRUCH-PERY e PEÉR, 1996; KATO et al., 1996; FRUCH-PERY et al., 1997; HEIGLE et al., 1997; TSENG et al., 1997; WILSON et al., 1997; USUBA e BATTISTELLA, 1999).

Em estudos experimentais realizados por HAUS e GALAND (1996), a MMC foi utilizada durante a hidrodissecção (com pausa de 5 minutos para ação da droga), em cirurgias extracapsulares para extração do cristalino de coelhos. Estes autores demonstraram que a MMC pode efetivamente diminuir a opacificação da cápsula posterior, uma complicação frequente que ocorre após cirurgias para a extração de cristalino em humanos.

A MMC a 0,02%, em aplicação intra-operatória por 30 minutos, está sendo utilizada também para evitar o crescimento de tecidos fibrosos na área da osteotomia em pós-operatórios de cirurgias de dacriocistorrinostomia (KAO et al., 1997) e no tratamento do penfigóide ocular. Nesta última condição a aplicação subconjuntival de MMC 0,02% na dose de 0,025ml nas conjuntivas bulbares superior e inferior diminuiu a progressão da cicatrização conjuntival (DONNENFELD et al. 1999). Uma outra indicação da MMC tópica visa diminuir a formação do “haze” em pós-operatórios de cirurgias refrativas (SCHIPPER et al., 1997; RAVIV et al., 2000).

Durante as cirurgias para correção de estrabismo a MMC foi aplicada sobre a inserção da musculatura extrínseca na concentração de 0,05% por 15 minutos e desta forma contribuiu para a prevenção de fibrose observada no período pós-operatório (CRUZ, 1996). Em 2000, MINGUINI e colaboradores observaram que não há diminuição da resposta inflamatória na musculatura extrínseca ocular quando a mitomicina C a 0,04% é aplicada em dose única por 5 minutos durante o período intra-operatório de cirurgias de estrabismo em coelhos.

1.2.3- Complicações relacionadas ao uso de MMC

A córnea e a conjuntiva são os tecidos que retêm as maiores quantidades de medicações que são instiladas no olho, sendo as células epiteliais da córnea mais susceptíveis aos efeitos citotóxicos cumulativos de drogas (BURSTEIN, 1980). Na presença de defeito epitelial da córnea, a MMC colocada em contato direto com a superfície desepitelizada provoca o retardo da recuperação celular em relação a olhos-controles e também em relação a outras drogas antimetabólicas (ANDO et al., 1992; MATTAR et al., 1994; MATTAR et al., 1995; ALVES e KARA JOSÉ, 1996).

O filme lacrimal, parte importante na manutenção da turgescência da córnea, é um dos principais elementos que contribuem para a perfeita acuidade visual, pois recobre a superfície ocular e está intimamente relacionado com o epitélio da córnea. Em alguns estudos em animais foram observadas a ação

deletéria no filme lacrimal durante o uso de drogas antimetabólicas, devido à diminuição do número de células caliciformes localizadas na superfície conjuntival. Estas células são responsáveis pela produção de mucina, componente fundamental na formação do filme lacrimal (DANJO et al., 1987; ALVES e BIGNARDI, 1997; HOLZCHUH et al., 1997).

ALVES et al. (1995) e CARDILLO et al. (1995c) observaram que não há alteração do filme lacrimal, da sensibilidade táctil da córnea e do epitélio córneo-conjuntival de olhos humanos operados de pterígio, quando se utilizam concentrações de 0,2mg/ml ou 0,4mg/ml em aplicação única intra-operatória por 3 minutos ou na forma de colírio tópico no pós-operatório, 1 gota de 6/6 horas por 7 dias ou 14 dias.

A dosagem mais segura da droga ainda permanece controversa. SINGH et al. (1988) utilizaram em seu estudo a dose de 1mg/ml de MMC de 6/6 horas por 15 dias, e sugeriram que altas concentrações da droga e o seu uso prolongado podem induzir toxicidade e complicações irreversíveis aos tecidos oculares. HAYASAKA et al. (1988) observaram que a administração de 0,4mg/ml de MMC de 8/8 horas por 7 dias apresenta maior índice de complicações e mesma eficácia, quando comparada com o uso de 0,2mg/ml de MMC de 12/12 horas por 5 dias. FRUCHT-PERY e ILSAR (1994) sugeriram o uso de 0,1mg/ml de MMC de 12/12 horas por 5 dias, como uma nova dosagem segura e eficaz.

O emprego da MMC em períodos maiores que duas semanas ou concentrações altas como 0,1% ou 1mg/ml pode ser tóxica para a conjuntiva e a córnea, acarretando várias complicações como dor ocular, blefaroespasmos, hiperemia da conjuntiva, erosão de córnea, uveítes, afilamentos da córnea e esclera até perfuração ocular (SINGH et al., 1988; RUBINFELD et al., 1992; FRUCHT-PERY e ROZENMAN, 1994). Em cirurgias antiglaucomatosas primárias ou combinadas com facectomia e implante de lente intra-ocular (LIO), a mitomicina C a 0,04% aplicada em dose única intra-operatória por 5 minutos contribuiu para o controle pós-operatório das pressões intra-oculares. Porém, algumas complicações associadas à filtração excessiva, como o descolamento de coróide, câmara anterior

rasa e maculopatia hipotônica, limitam o uso da mesma (COSTA et al., 1993a; COSTA et al., 1993b; MANDIA JR. e RODRIGUES, 2002).

Alguns estudos relacionam a técnica cirúrgica empregada com a diminuição dos índices de complicações da MMC. Nos procedimentos nos quais foi utilizada a técnica de esclera exposta, os índices de complicações foram maiores do que aqueles relatados para os casos operados com técnica que recobre a esclera na área de aplicação da MMC (RUBINFELD et al., 1992; CARDILLO et al., 1995a; POTÉRIO et al., 1998).

O contato da MMC com defeitos epiteliais na córnea e esclera pode influenciar na diferenciação das células do epitélio basal e de células germinativas na região límbica, podendo predispor os tecidos a sérias complicações. A delaminação da esclera e da córnea durante a ressecção do pterígio bem como a excessiva cauterização para diminuição do sangramento intra-operatório contribuem para defeitos na vascularização escleral e episcleral. Na técnica de esclera exposta, o tecido escleral, fica mais susceptível à complicações pela exposição e à diminuição da proliferação celular devido à atuação da droga (POTÉRIO et al., 1998).

1.2.4- O epitélio da córnea de humanos

O epitélio da córnea é do tipo pavimentoso, estratificado, não ceratinizado e representa 10 a 12% da espessura total da córnea humana (KLYCE e BEVERMAN, 1988; ARFFA, 1991). É constituído de 5 a 6 camadas celulares no centro e por 8 a 10 na periferia (HOGAN et al., 1971; KENYON, 1979). Sob microscopia óptica, diferenciam-se três grupos de células: a) superficiais ou escamosas, b) intermediárias ou aladas e c) basais ou colunares.

O epitélio da córnea é mantido por um ciclo constante de desprendimento das células superficiais e pela proliferação das mesmas da membrana basal. As células superficiais são as mais externas e diferenciadas. Elas estão em constante 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 estão cobertas por densa camada de microvilos aderentes, como glicocálice (TSENG, 1989). O glicocálice interage com a camada de mucina lacrimal para promover a formação de filme lacrimal estável e homogêneo na superfície da córnea. Apesar de a porção mais externa estar se degenerando, constitui importante barreira entre a lágrima e a porção mais interna da córnea (POWER e NEVES, 1997).

As células intermediárias ou aladas formam 2 a 3 camadas de células em estado intermediário de diferenciação e apresentam citoplasma denso, superfície de convexidade anterior e núcleo achatado, em um plano paralelo com a superfície da córnea. Numerosos desmossomos unem estas células entre si e às células basais (HOGAN et al., 1971; Mc DERMOTT, 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 (SOONG e FAIRLEY, 1985; HOGAN et al., 1971; BINDER et al., 1980). 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 da córnea, 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 (TERVO et al., 1986; Mc DERMOTT, 1994).

O epitélio da córnea mantém sua população celular em equilíbrio dinâmico entre perda e renovação e tem capacidade de auto-renovação rápida. Ele possui um reservatório de células conhecidas como células matrizes germinativas semelhantes a outros órgãos que possuem este 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 curto. A repopulação de células epiteliais ocorre por uma migração celular centrípeta, ou seja, da periferia para o centro da córnea, e vertical (THOFT e FRIEND, 1983; BUCK, 1985; SCHERMER et al., 1986; LAVKER et al., 1988; COTSARELIS et al., 1989; TSENG, 1989; HUANG e TSENG, 1991).

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 da córnea pode ser dividido em 3 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 hemidesmossômicas à membrana basal. As células aumentam e a capa epitelial começa a migrar, com movimentos amebóides, para cobrir o defeito (KLYCE e 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 hemidesmossomos aumenta até o 41º dia após o trauma. Novos hemidesmossomos 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 demonstram a demora de até 12 meses para desenvolver os complexos de adesão normais (TSENG, 1989; ALVES e KARA JOSÉ, 1997).

A deficiência das células germinativas pode originar doenças da córnea 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 sua regeneração fica comprometida (CHEN e TSENG, 1990). Para reparação destes defeitos, ocorre migração do 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 evidenciada pela presença de células caliciformes conjuntivais na superfície da córnea (ALVES e KARA-JOSÉ, 1997).

O alto nível de proliferação celular observado normalmente na periferia da córnea pode desenvolver uma população de células capaz de pressionar e assim causar a migração de células para a região central da córnea (REN et al., 1999).

JABBUR et al. (1994) estudaram o efeito da MMC nas células germinativas do limbo, após realização de um defeito epitelial da córnea de coelhos e do uso tópico dessa droga. Concluíram que 3 meses após o uso da droga, era possível identificar interferência na proliferação destas células e no processo de diferenciação do epitélio da córnea. O efeito prolongado na diferenciação das células epiteliais da córnea poderia explicar algumas das graves complicações da MMC, desencadeadas no pós-operatório do pterígio, como defeitos epiteliais crônicos, ulcerações de córnea e esclerais e perfuração do globo ocular. As implicações clínicas destes achados e o significado deles a longo prazo ainda não foram esclarecidos.

O mecanismo de regulação da proliferação das células basais, a diferenciação e descamação das células epiteliais e a quantidade de células que devem migrar para a superfície central da córnea, a partir das células basais ainda permanecem desconhecidos.

1.2.5- O epitélio de córnea de coelhos

Segundo HANNA e O'BRIEN (1960), ao utilizar H-timidina e autoradiografia, observou-se que aproximadamente 1 em cada 75 células da membrana basal do epitélio de coelhos permanecia na fase pré-mitótica por um período de duas horas. Os autores concluíram que o epitélio da córnea de coelhos possui um ciclo de proliferação celular de 3,5 a 7,0 dias, calculados a partir da membrana basal até a chegada da célula na superfície epitelial.

A espessura da córnea não é menor que 0,3mm no centro e 0,4mm na periferia, e pode ser variável entre as diferentes raças. A média encontrada por diversos autores foi de 0,37mm na região central e 0,45mm na periferia (THOMAS, 1964). Como não há nenhum sulco definindo a região de transição entre a córnea e a esclera, esta diferenciação se faz com o auxílio da microscopia óptica, identificando-se a zona de pigmento anterior (quando presente), ou posteriormente pela união dos pilares da íris com a superfície posterior da região de transição corneoescleral. Macroscopicamente, o limite entre as duas estruturas pode ser identificado pela mudança entre o tecido opaco (esclera) e o transparente (córnea).

O epitélio da córnea dos coelhos apresenta índice refrativo de 1,40 sob luz vermelha e 1,47 em luz azul. É mais fino que o epitélio humano em aproximadamente 30 a 40 μ . O epitélio constituído por uma camada de células colunares basais alongadas, de aproximadamente 17,5 μ de altura, com núcleos de 10 μ de diâmetro. Localiza-se sob duas camadas de células poligonais e de seis camadas de células anelares e escamosas que permanecem na superfície mais externa. As células colunares possuem projeções para a superfície basal que se ajustam em pequenas depressões na membrana basal. Nestas projeções filamentos citoplásmicos convergem até a membrana basal (desmossomos). Os desmossomos são menos visíveis quando comparados ao tecido humano. São mais localizados entre as células da membrana basal, nas células intermediárias e superficiais. Após a zona pigmentada, as células basais se tornam planas, e o número de camadas de

células epiteliais está reduzido ao número de camadas encontradas no tecido escleral (THOMAS, 1964).

As células epiteliais estão em constante descamação nas camadas superficiais e a constante reposição provém da camada de células colunares basais que gradualmente mudam de forma até chegarem às camadas superficiais. A atividade mitótica encontra-se principalmente na camada basal, e são auxiliadas pelas camadas intermediárias, onde esta atividade é proporcionalmente menor. Nas camadas superiores, esta atividade é inexistente. O núcleo das células superficiais é diferente das camadas mais internas. Esta mudança pode estar relacionada com o processo degenerativo que ocorre previamente à descamação. Ao chegar à superfície da córnea, as células iniciam um processo de desintegração em pequenos fragmentos de núcleos, desmossomos e de organelas. A superfície da córnea de coelhos apresenta maior grau de ceratinização em relação ao mesmo tecido humano.

A quantidade de células mitóticas varia de acordo com a idade do animal, momento do dia e região da córnea. O maior índice de proliferação encontra-se na periferia da córnea de animais em crescimento e diminui com o aumento da idade. Nos animais adultos a atividade mitótica é maior na área central da córnea. Nos animais jovens, a extensão da superfície da córnea modificada pelo crescimento é o principal responsável pelo aumento da atividade mitótica.

Quando o epitélio da córnea é removido, a regeneração é rápida e não finaliza até ultrapassar a espessura original do tecido em 200% em 24 horas. A espessura original é retomada em 1 até 4 dias. Se todo o epitélio é removido, uma nova camada epitelial é produzida a partir das células do limbo, por uma metaplasia do epitélio conjuntival, e cobre completamente a área desnuda em 3 até 6 dias. Em aproximadamente duas semanas, haverá mais de três camadas de células planas (THOMAS, 1964).

Lesões superficiais do epitélio da córnea são cobertas por células basais vizinhas em poucas horas, porém grandes desepitelizações envolvem a migração de células de todas as camadas mais próximas da área atingida.

1.2.6- Marcadores de proliferação e diferenciação celular

Os efeitos a curto e longo prazo da MMC aplicada topicamente nas concentrações de 0,02% e 0,04% sobre o bulbo ocular não são totalmente definidos.

Os marcadores de diferenciação e proliferação celular são utilizados em estudos que visam investigar possíveis modificações da cinética celular sob a ação de drogas (HOLZCHUH, 1999) ou sob influência de outros fatores, como a do uso excessivo de lentes de contato na proliferação celular (REN et al., 1999).

Dentre os marcadores de diferenciação celular, destacam-se as citoceratinas. As ceratinas são uma família de proteínas de 40-70 Kd. São insolúveis em água e formam filamentos intermediários (10nm de diâmetro) compostos de quatro ou cinco tipos de polipeptídeos, distintas do ponto de vista imunológico e bioquímico, presentes em quase todos os tecidos epiteliais, tanto “in vivo” como em cultura. A composição desses filamentos é extremamente variada e o significado biológico dessa diversidade ainda não está totalmente elucidado (SCHERMER et al., 1986). A distribuição tissular das ceratinas foi avaliada por TSENG et al. (1982), que utilizaram anticorpos monoclonais designados AE1, AE2 e AE3. Esses anticorpos são altamente específicos para as ceratinas e, quando combinados, permitem a identificação de grande parte das ceratinas humanas. De acordo com esses autores o padrão de distribuição de ceratinas encontrado em tecidos humanos, de coelhos e de duas espécies de macacos foi semelhante. Assim sendo, concluíram que o padrão de ceratinas se mantém aparentemente conservado com a evolução das espécies.

As ceratinas são consideradas excelentes marcadores de diferenciação celular (FRANKE et al., 1978; SUN e GREEN, 1978; SUN et al., 1979). Estudos imunológicos, bioquímicos, e análises de cDNA, estabeleceram a existência de aproximadamente 20 ceratinas humanas diferentes que podem ser divididas em sub-famílias, as ácidas (tipo I) e as básicas (tipo II) de acordo com suas cargas, imunorreatividade, mRNA, seqüência de aminoácidos etc. (MOLL et al., 1982; COOPER et al., 1985; FUCHS et al., 1985; QUINLAN et al., 1985).

Algumas regras definem a forma de expressão das ceratinas. Existem pares específicos de ceratinas formados por um membro da subfamília ácida e outro da básica. Em cada par as duas ceratinas ocupam posições semelhantes dentro de suas respectivas subfamílias e parecem seguir as mesmas regras de expressão. No epitélio normal há pares de ceratinas 50-58kd presentes na maioria dos ceratócitos. Esses pares são complementados por um outro par de ceratinas que é característico do programa de diferenciação celular. Por exemplo, os dois maiores membros das duas subfamílias, a ácida de 56,5kd (n.º 10 do catálogo MOLL ou HK10) e a básica de 65-67kd (HK1 e 2), são encontrados em epitélios ceratinizados, principalmente, e são consideradas marcadores de ceratinização (MOLL et al., 1982). Na seqüência de tamanho, as ceratinas ácidas de 55kd (HK12) e a básica de 64kd (HK3) formam um segundo par que parece ser marcador específico para a diferenciação do tecido da córnea (SUN et al., 1984).

Essas ceratinas podem ser reconhecidas pelos anticorpos AE1 e AE3 e assim empregou-se neste estudo a mistura dos dois anticorpos, que de acordo com COOPER et al. (1985) é capaz de reconhecer todas as ceratinas básicas além de grande parte das ceratinas ácidas. O AE5 é um anticorpo monoclonal, altamente específico para a ceratina de 64kd, e é considerado marcador específico da célula epitelial da córnea diferenciada.

Dentre os marcadores de proliferação celular, destaca-se a 5-bromo-2-deoxiuridina (bromodeoxiuridina ou BrdU), que é uma pirimidina análoga da timidina e é seletivamente incorporada ao DNA celular durante a fase S do ciclo celular (WARNAKULASURIYA e JOHNSON, 1993). Para identificação das células

que incorporam a bromodeoxiuridina “in vivo” ou “in vitro” são utilizados anticorpos anti-BrdU em técnicas de imunistoquímica (GRATZER, 1982).

A BrdU também é utilizada na detecção de alterações cromossômicas, na avaliação da sensibilidade das células tumorais à quimioterapia ou radioterapia, na detecção da reatividade de linfócitos estimulados por antígenos e na avaliação dos efeitos inibitórios ou estimulatórios de substâncias na proliferação celular, como os fatores de crescimento ou citocinas (VAN DIEST et al., 1998).

Por ser radiosensível, a BrdU também é utilizada no tratamento de gliomas malignos (VANDER et al., 1990).

1.2.7- Método experimental

SHAPIRO et al., em 1985, demonstraram que nos primeiros quatro dias que se seguem à realização de um defeito epitelial da córnea de 10mm de diâmetro, em coelhos, a taxa de mitose epitelial é marcadamente elevada, promovendo um método de se conseguir elevada taxa de mitose epitelial (hiperproliferação celular).

MATTAR et al. (1994) demonstraram que a instilação única de mitomicina C a 0,02% por 5 minutos após desepitelização da córnea de coelhos retarda significativamente a reparação da área lesada (hipoproliferação celular) e que os efeitos são dose-relacionados. Olhos normais com a taxa de mitose epitelial fisiológica compuseram o grupo controle.

Estudos realizados utilizando-se diferentes técnicas cirúrgicas para ressecção de pterígio em associação com a MMC demonstraram que os resultados cirúrgicos, além das complicações pós-operatórias, podem variar de acordo com a técnica cirúrgica escolhida (RUBINFELD et al., 1992; CARDILLO et al., 1995a; POTÉRIO et al., 1998).

Nesta investigação a diferenciação e a proliferação celulares do epitélio da córnea de coelhas foram avaliados em olhos que receberam a MMC na concentração de 0,02% e solução de cloreto de sódio a 0,9% (grupo controle) aplicadas, em dose única, no intra-operatório por 3 minutos, com o tecido da córnea íntegro e após a desepitelização do mesmo. Para avaliar os efeitos tardios da MMC, a análise da proliferação, após utilização do marcador BrdU e o padrão de diferenciação celular com os marcadores AE1, AE3 e AE5, foi efetuada em diferentes tempos de pós-operatório.



2. OBJETIVOS

2.1- OJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da MMC nas células epiteliais da córnea de coelhos.

2.2- OJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a influência da solução de MMC aplicada, topicamente, antes e após a desepitelização parcial da córnea:

- a) na inibição da proliferação das células epiteliais da córnea;
- b) no processo de diferenciação dessas células;
- c) no surgimento de complicações pós-operatórias.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- EXPERIMENTOS

Os experimentos em animais foram realizados no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As peças, com o material destinado ao estudo imunoistoquímico, foram preparadas no Laboratório de Anatomia Patológica Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, seguindo a técnica histológica para cortes em parafina. Os procedimentos imunoistoquímicos com o reagente BrdU, foram realizados no laboratório da Disciplina de Nefrologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM). Os procedimentos com os reagentes AE1, AE3 e AE5 foram realizados no laboratório da Patologia Experimental do Centro de Atenção Integrada à Saúde da Mulher (CAISM), ambos pertencentes à Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

3.1.1- Aspectos éticos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados após a constatação do perfeito estado de saúde dos animais, de acordo com as normas da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) – (Anexo 1), e as normas para o uso de animais em experimentos científicos estipuladas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) – (Anexo 2). O protocolo deste estudo foi previamente aprovado pelo Conselho de Ética do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP (nº 475-2).

3.2- DROGAS E SOLUÇÕES UTILIZADAS

Os produtos listados neste item foram adquiridos na forma comercializada pelos laboratórios, a saber:

- Cloridrato de Cetamina (Ketamin) - Laboratório Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.
- Cloridrato de 2-(2,6 xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompun) - Laboratório Bayer S. A. - Saúde Animal.

- Pentobarbital Sódico - Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.
- Solução de Cloreto de Sódio a 0.9% (SF) - Darrow Laboratório S.A.
- Colírio anestésico contendo: tetracaína (10mg/ml), cloridrato de fenilefrina (1mg/ml), ácido bórico (15mg/ml) – Laboratório Allergan-Lok Produtos Farmacêuticos Ltda.
- Violeta de Genciana – Farmácia Ophthalmos
- Álcool Etílico a 95% - Farmácia Ophthalmos.
- Colírio de Fluoresceína Sódica na concentração de 2% - Laboratório E. Merck, Darmstadt – Alemanha.
- Mitocin (Mitomicina C) – Laboratório Bristol-Myers Squibb.
- Colírio de Dexametasona 1mg/ml e Cloranfenicol 5mg/ml – Laboratório Allergan-Lok Produtos Farmacêuticos Ltda.
- Solução de Paraformaldeído a 10%.
- Solução contendo 5-Bromo-2-Deoxiuridina (BrdU) – Calbiochem – Laboratório Sigma.
- Anticorpo anti BrdU – Laboratório DAKO.
- Anticorpo AE1/ AE3 – Laboratório DAKO.
- Anticorpo AE5 – Laboratório Progem Biotechnik GMBH.

3.2.1- Preparo das soluções

3.2.1.1- Mitomicina C

Essa solução (na concentração de 0,02%) foi preparada no laboratório da Disciplina de Nefrologia - UNICAMP, no dia anterior aos procedimentos cirúrgicos, diluindo-se 0,2mg do pó liofilizado de “Mitocin” em 1ml de água destilada com pH de 6,8 e osmolaridade de 8,0 mOsm/l.

3.2.1.2- Solução de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU)

A solução foi preparada no Laboratório de Patologia Experimental - CAISM, UNICAMP, dissolvendo-se 100mg de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) em soro fisiológico a 0,9% (SF) até a obtenção de uma concentração final de 20mg/ml com pH = 7,4.

3.2.1.3- Álcool Etílico a 95 %

Diluição do álcool a 99,99% com água destilada até 95%.

3.2.1.4- Diaminobenzidina (DAB)

Utilizaram-se 60mg de DAB e a solução foi preparada com 100ml de Phosphate Buffer Saline (PBS), 500µl de H₂O₂(30%) e 1ml de Dimethyl Sulfoxite (DMSO).

3.2.2- Preparo dos anticorpos

Os reagentes AE1/AE3 e AE5 foram diluídos em PBS, numa proporção 1:50 mantendo-se pH 7,5.

3.3- ANIMAIS

Utilizaram-se 27 coelhos fêmeas, com idade entre 2 e 4 meses, da raça Nova Zelândia, pesando entre 800 e 1.900 gramas (média de 1.135,60 gramas), provenientes da cunicultura da Cunha, pertencente à Granja Grota Azul. Antes de serem incluídos no estudo, todos os animais foram acondicionados em gaiolas individuais em ambiente com temperatura constante (21°C). Os animais apresentavam estado geral de saúde bom, livres de ecto e endoparasitas.

3.3.1- Identificação dos animais

Todas as coelhas foram pesadas e em seguida colocadas em gaiolas individuais, marcadas com uma letra (A, B ou C), que correspondia ao lote ao qual pertenciam os animais. A identificação específica de cada animal foi efetuada utilizando-se caneta hidrográfica, inscrevendo-se nas duas orelhas um número, de 1 a 27.

3.4- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi um estudo duplo cego, no qual o operador desconhecia o tipo de solução empregada para o tratamento. Com esta finalidade, a solução de mitomicina C a 0,02% (MMC) foi previamente preparada por um profissional, que não participou dos procedimentos cirúrgicos e nem das análises laboratoriais. Na mesma ocasião foi preparada uma solução de violeta de genciana (placebo), 1 gota diluída em cloreto de sódio a 0,9% (SF) até atingir a coloração violácea semelhante à da solução de MMC.

As duas soluções (MMC e SF) foram acondicionadas em frascos iguais e identificados com os numerais 1 e 2.

Em cada experimento a solução a ser empregada na área episcleral foi determinada por meio de sorteio e aplicada nos dois olhos do mesmo animal.

Para testar os efeitos da MMC sobre a proliferação das células epiteliais foram empregadas duas técnicas cirúrgicas que diferiam entre si quanto à presença ou não de desepitelização da córnea quando da aplicação da droga. A primeira será denominada deste ponto em diante “técnica de desepitelização parcial prévia ou desepitelização parcial da córnea antes da aplicação da solução”, e a segunda de “técnica de desepitelização parcial da córnea após a aplicação da solução”.

Os efeitos tardios da MMC sobre a proliferação celular foram avaliados aos 15 e 45 dias de pós-operatório.

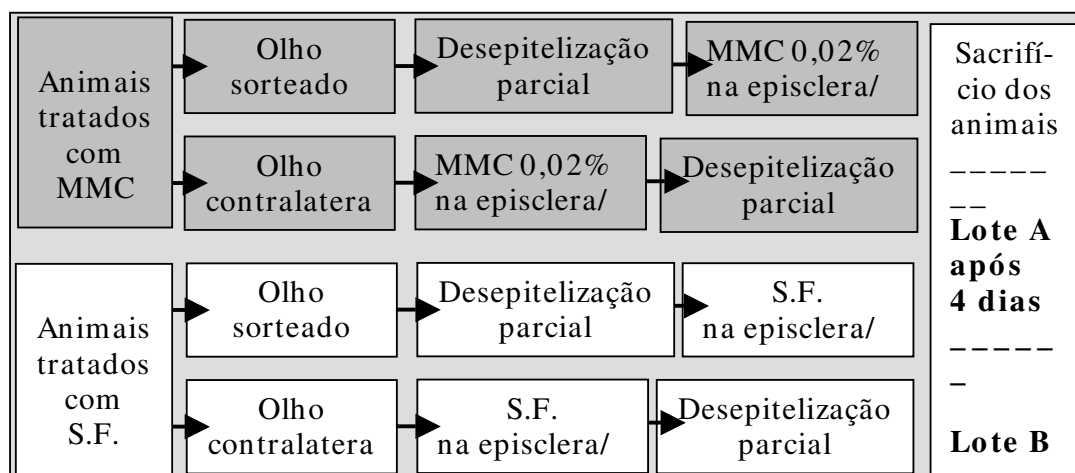
As análises das lâminas foram executadas sem o conhecimento prévio do procedimento cirúrgico e de qual lote de animais provinha o material de estudo.

3.5- FORMAÇÃO DOS LOTES DE ANIMAIS

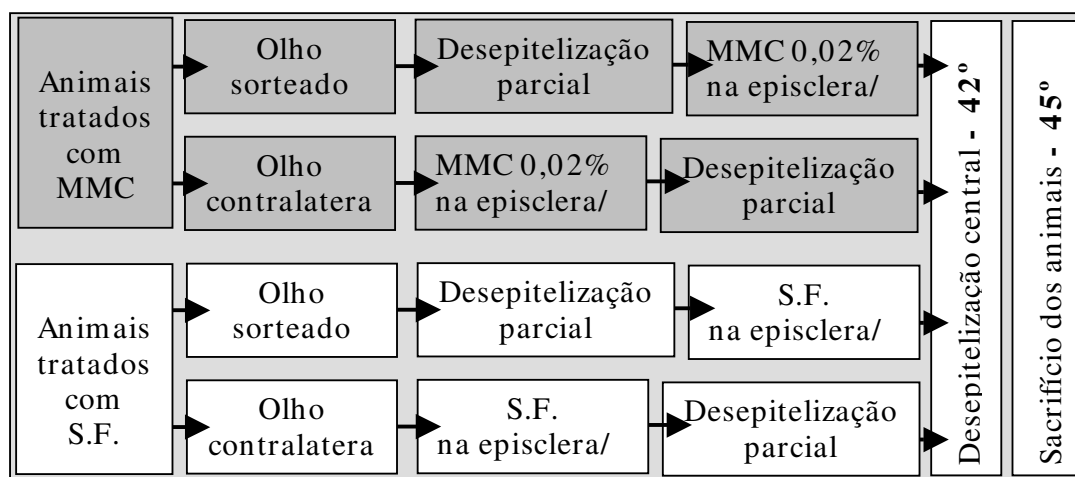
Após exame biomicroscópico dos olhos com lâmpada de fenda, para afastar as anormalidades da superfície córneo-conjuntival e/ou da pálpebra, os animais foram aleatoriamente distribuídos em 3 lotes (A, B e C) de acordo com o tempo estipulado para o sacrifício do animal. No lote A este tempo foi de 4 dias; no lote B foi de 15 dias, e no lote C, de 45 dias. Os lotes A, B e C continham respectivamente: 11 coelhas (22 olhos), 8 animais (16 olhos) e 8 animais (16 olhos).

Nos 3 lotes foram gerados 2 sublotes, por sorteio. Nos sublotes os animais receberam ou não a MMC (sublote com MMC e sublote com SF, respectivamente). Em todos os sublotes, cada coelho foi submetido às duas técnicas cirúrgicas tendo-se aplicado uma delas em cada olho. A técnica e o olho no qual cada técnica foi aplicada foram definidos por sorteio (quadros 1 e 2).

Quadro 1 – Fluxograma dos experimentos com os animais dos lotes – A e B.



Quadro 2 – Fluxograma dos experimentos com os animais do lote – C.



3.6- PROCEDIMENTOS REALIZADOS NOS ANIMAIS

Imediatamente antes do procedimento cirúrgico as coelhas foram anestesiadas com uma mistura de cetamina na dose de 50mg.kg⁻¹ e de “Rompun” na dose de 5mg.kg⁻¹, aplicada por via intramuscular. A anestesia tópica foi realizada instilando-se tetracaína a 0,5% (1 gota/olho), após a irrigação dos olhos com solução de cloreto de sódio 0.9%.

3.6.1- Experimentos realizados com desepitelização parcial da córnea antes da aplicação da solução

Após o sorteio que definia o olho a ser operado com esta técnica, em todos os procedimentos obedeceu-se à seguinte rotina:

- a) colocação de blefarostato para permitir abertura palpebral, de forma eficiente;
- b) utilização de marcador de zona óptica de 8,00mm de diâmetro, corado previamente em violeta de genciana para demarcar a área conjuntival e a córnea temporal;
- c) centralização do marcador de zona óptica no limbo temporal na região correspondente às 9:00 horas para o olho direito e às 3:00 horas para o olho esquerdo de cada coelha (figura 2);
- d) pinçamento e ressecção com tesoura de Wescott da área conjuntival demarcada, para deixar a episclera exposta;
- e) desidratação com álcool etílico 95%, aplicado com o auxílio de um cotonete, por aproximadamente 30 segundos, das células epiteliais da área da córnea previamente demarcada. Irrigação com solução de cloreto de sódio 0,9% (SF);

- f) desepitelização da área da córnea demarcada com o emprego de bisturi (lâmina 15);
- g) aplicação de 2 gotas de fluoresceína sódica a 2% para a avaliação da eficácia da ablação epitelial. Irrigação com solução de cloreto de sódio 0,9%;
- h) aplicação na área episcleral, por 3 minutos, de uma esponja de “weck-cel”, com dimensões de 5,0mm de largura por 3,0mm de comprimento (Weck-cel modelo C00054, Edward & Company, Treton, NJ), embebida na solução sorteada para o coelho; irrigação da área episcleral com 100ml de solução de cloreto de sódio 0,9%;
- i) sutura das bordas da incisão conjuntival com pontos simples de fio absorvível 8-0.

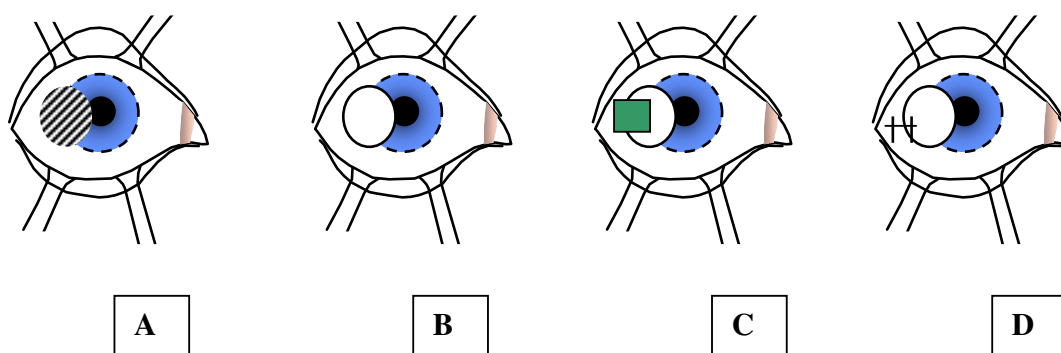


Figura 2– Representação esquemática da técnica cirúrgica de desepitelização parcial prévia: **A)** marcador de zona óptica de 8,0mm de diâmetro posicionado na região límbica temporal de olho direito do coelho; **B)** a região demarcada abrange a área da córnea desepitelizada e a área episcleral exposta; **C)** a esponja de “weck-cell” embebida em solução é aplicada na região

3.6.2- Experimento realizado com desepitelização parcial da córnea após a aplicação da solução

Nos olhos operados com esta técnica a aplicação da MMC foi efetuada após a execução dos itens de a-d, como descritos para o estudo com a córnea previamente lesada (em **3.6.1** – pg. 85), mas com o tecido da córnea ainda íntegro. Completou-se o procedimento com a seguinte rotina:

- a) aplicação na área episcleral desnuda, por 3 minutos, de uma esponja de “weck-cel” com dimensões de 5,0mm de largura por 3,0mm de comprimento (weck-cel modelo C00054, Edward & Company, Treton, NJ) embebida em solução sorteada para o animal;
- b) irrigação da área episcleral com 100ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%;
- c) remoção da área epitelial da córnea de acordo com a técnica de estudo com defeito epitelial prévio (**3.6.1**, itens de e – g);
- d) sutura das bordas da incisão conjuntival com pontos simples de fio absorvível 8-0 (figura 3);

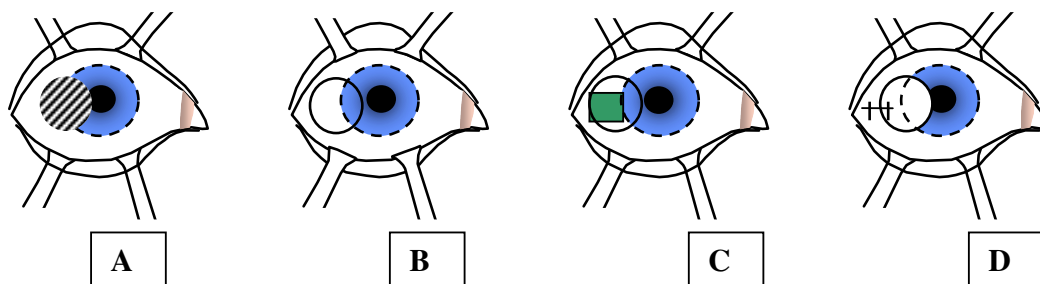


Figura 3 – Representação esquemática da técnica cirúrgica de desepitelização parcial da córnea após a aplicação da solução: **A)** marcador de zona óptica de 8,0mm de diâmetro posicionado na região límbica temporal de olho direito de coelho; **B)** a região demarcada abrange a área da córnea íntegra e a área episcleral exposta; **C)** a esponja de “weck-cell” embebida em solução é aplicada na região episcleral; **D)** a córnea demarcada é desidratada e desepitelizada e a seguir a conjuntiva suturada com fio absorvível 8-0.

3.6.3- Avaliação tardia dos efeitos da MMC sob a proliferação e diferenciação celular

Esta avaliação foi realizada nos animais do lote C. Para tal, os animais foram submetidos a desepitelização da área central da córnea, no 42º dia de pós-operatório e em seguida mantidos sob observação por mais três dias, quando então foram sacrificados.

Para a desepitelização, obedeceu-se à seguinte rotina:

- a) a) colocação de blefarostato para permitir a eficiente abertura palpebral;
- b) utilização de marcador de zona óptica de 8,00mm de diâmetro, corado previamente em violeta de genciana para demarcar a área central da córnea;

- c) desidratação das células epiteliais da córnea na área previamente demarcada, com álcool etílico 95%, aplicado por aproximadamente 30 segundos com o auxílio de um cotonete;
- d) irrigação com solução de cloreto de sódio 0,9%;
- e) desepitelização da área da córnea demarcada com o emprego de bisturi lâmina 15;
- f) aplicação de 2 gotas de fluoresceína sódica a 2% para avaliação da eficácia da ablação epitelial;
- g) irrigação com solução de cloreto de sódio 0,9%, como esquematizado na figura 4;

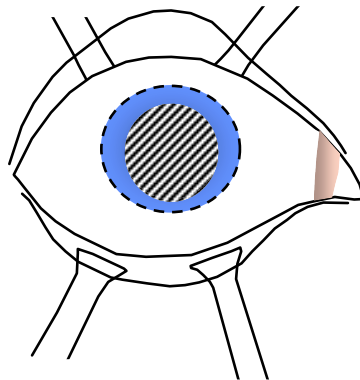


Figura 4 – Representação esquemática da colocação do marcador de zona óptica de 8,0mm de diâmetro posicionado na região central da córnea do coelho. A região demarcada abrange a área da córnea que foi desepitelizada três dias antes do sacrifício dos animais do

3.7- CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Neste período assim como foi feito no pré-operatório, foram oferecidas aos coelhos comida e água *ad libitum*.

Todos os animais foram tratados com a instilação de colírio de dexametasona e cloranfenicol, 1 gota em cada olho, de 8/8 horas, durante sete dias.

O processo de cicatrização da superfície epitelial foi acompanhado macroscopicamente nos primeiros 7 dias de pós-operatório, anotando-se a presença de secreção, hiperemia, lacrimejamento, fotofobia, alterações no aspecto dos tecidos oculares, como afilamentos ou neovascularizações.

Na avaliação biomicroscópica pós-operatória, realizada no dia do sacrifício do animal, foi pesquisado a presença de secreção, hiperemia, neovascularização de córnea e afilamentos de córnea e/ou esclera, além de examinadas as bordas palpebrais e a conjuntiva.

Foram consideradas, como complicações, a presença de: secreção, hiperemia e afilamento da córnea e/ou da esclera. Essas variáveis foram avaliadas semiquantitativamente, estabelecendo-se a seguinte contagem:

ausência	-
intensidade discreta	+
intensidade moderada	++
intensidade máxima	+++

3.8 - APLICAÇÃO DO REAGENTE BrdU

A solução de BrdU (20mg/ml) foi injetada em todos os animais por via endovenosa, na veia marginal da orelha na dose de 100mg/kg, 24 horas antes do sacrifício (protocolo seguido pelo laboratório de Nefrologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP)

3.9 - SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

No tempo estipulado para o lote ao qual pertencia o animal e imediatamente após o exame biomicroscópico de controle os animais receberam uma dose letal de tiopental a 3% (25mg/kg de peso vivo), injetada na veia marginal da orelha. Inicialmente procedeu-se a anestesia e a seguir aprofundamento anestésico até o óbito do animal.

3.10 - RETIRADA DOS TECIDOS PARA ANÁLISE LABORATORIAL

Imediatamente após o sacrifício do animal, as córneas foram fixadas *in situ* perfundindo-se a câmara anterior com paraformaldeído diluído em fosfato 1% por 5 minutos. Os tecidos foram ressecados a partir de uma perfuração da esclera na região nasal a 2mm do limbo com bisturi lâmina 11. Com tesoura de “Wescott” completou-se a extirpação da córnea, incluindo o limbo. O material retirado foi conservado em formalina tamponada a 10%.

Uma marcação com fio seda 4-0 foi realizada na região escleral nasal exatamente oposta à área submetida ao procedimento cirúrgico, como ponto de referência para as análises microscópicas das diferentes regiões da córnea. Todos os frascos foram identificados para posterior inclusão do material em parafina.

3.11- PROCESSAMENTO DAS LÂMINAS

Os tecidos fixados em formalina tamponada a 10% foram processados em parafina, seguindo-se a técnica histológica de rotina do Laboratório do Departamento de Anatomia Patológica da FCM – UNICAMP. Foram feitos cortes de 4µm em lâminas previamente silanizadas para a realização do estudo imunoistoquímico, descrito a seguir:

3.12- PROCESSAMENTO IMUNOISTOQUÍMICO

Foram coradas lâminas controle positivo e negativo em todas as reações. As lâminas controle positivo foram preparadas com tecido sabidamente positivo para os antígenos estudados (tecidos neoplásicos para os reagentes AE1/ AE3 e AE5 e tecido contendo glomérulos renais para o BrdU). As lâminas para o controle negativo foram submetidas ao processamento usual, mas sem a incubação com o anticorpo primário.

3.12.1- Anticorpos primários – AE1/AE3 e AE5

A absorção dos reagentes AE1/ AE3 e AE5 pelas células, após reação com as citoceratinas do epitélio da córnea, foi revelada pelo método ABC (complexo redutor-estreptovidina e biotina peroxidase revelada).

1ª Etapa - Desparafinação

As lâminas foram imersas, em xilol I previamente aquecido em estufa a 110°C por ± 30 minutos, e a seguir receberam dois banhos a temperatura ambiente. A seguir foram imersas em gradientes decrescentes de álcool (100% – 50%), e lavadas em água corrente e destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em H₂O₂ 3% com três banhos de 3 minutos cada um. A seguir, lavagens em água corrente e em água destilada. A recuperação antigênica durante 30 minutos foi realizada em panela a vapor a 95°C contendo tampão citrato 10mM - pH = 6,0. As lâminas foram lavadas em água corrente e a seguir em água destilada e PBS por 5

minutos. A seguir foram incubadas com anticorpo primário específico em câmara úmida por 30 minutos em temperatura de 37°C e “overnight” a 4°C.

Após a incubação com anticorpo primário foram realizadas três lavagens no agitador, em PBS, em temperatura ambiente por 5 minutos cada uma.

O anticorpo secundário – “Multi-Link” diluído em PBS 1:80, foi incubado por 1 hora a 37°C. Após lavagens por três vezes, em agitador, em PBS a temperatura ambiente por 5 minutos cada etapa, aplicou-se o complexo ABC diluído em PBS a 1:100. Incubação por 40 minutos a 37°C.

A revelação foi feita com o diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram colocadas no tampão PBS e coradas por 5 minutos com DAB, previamente preparado. A expressão positiva foi considerada na presença de coloração marrom escura nas células.

A contracoloração com Hematoxilina de Mayer (tonalidade tecidual azul-clara) foi realizada por 30 a 60 segundos. A seguir prosseguiu-se a lavagem em água amoniacal (NH₄OH) e passagem por água corrente e destilada por alguns segundos. Seguiu-se a desidratação dos cortes em três banhos de álcool e três banhos em xilol e a montagem das lâminas em Entellan.

3.12.2- O reagente BrdU

No dia anterior ao início do experimento laboratorial, as lâminas foram incubadas por 1 hora a 110°C e durante toda a noite a 60°C. No dia do experimento as lâminas foram submetidas à desparafinação com xilol I a 60°C seguido de dois banhos de xilol a temperatura ambiente e passagem em gradientes decrescentes de álcool (100% - 50%). Seguiu-se a lavagem das lâminas com água destilada, por 3 vezes, e em PBS por 3 vezes. O pré-tratamento com pepsina a 0,005g em 100ml de PBS a 37°C, foi aplicado por 2 minutos. A seguir preparou-se 2NHCl em banho a 31°C, e as lâminas permaneceram na solução por 20 minutos. Os tecidos foram

colocados em leite desnatado Molico 1g para 100ml de PBS previamente homogeneizado por 1 hora em temperatura ambiente.

A incubação foi realizada com o anticorpo primário anti-BrdU diluído em 1:50 em albumina bovina (BSA) a 1% por 1 hora em câmara úmida e escura. Após banho por 5 minutos com PBS por 3 vezes as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário Multi-Link 1:80 em BSA por 1 hora em câmara úmida e escura. A seguir prosseguiu-se o bloqueio endógeno com peroxidase em H₂O₂ a 3% por 5 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS 2 vezes.

Aplicou-se o complexo ABC diluído em PBS (A e B = 1:50) previamente preparado que permaneceu por 30 minutos em câmara úmida. As lâminas foram então lavadas com PBS por 3 vezes e o DAB (diaminobenzidina), na proporção de 1 gota em 1ml do tampão, foi aplicado. Imediatamente após a reação com o DAB, as lâminas foram lavadas com água destilada corrente e banhadas em 1ml de hidróxido de amônio diluído na água destilada. Após lavagem contínua com água destilada por 10 minutos e desidratação com três banhos de álcool em concentrações crescentes (70% - 100%) e três banhos de xilol, as lâminas foram montadas com Etellan.

3.13- ANÁLISE DO PADRÃO DE DIFERENCIAÇÃO DO EPITÉLIO DA CÓRNEA - IMUNOISTOQUÍMICA

Para a análise do padrão de diferenciação das células epiteliais das regiões límbica e central da córnea foram empregados os seguintes anticorpos:

- o reagente AE1 para as células epiteliais que apresentam citoceratinas de 40 – 56kd e o reagente AE3 para as citoceratinas de 52 – 67kd;
- o reagente AE5 para as citoceratinas de 64kd, específicas do epitélio da córnea de coelhos.

Segundo HOLZCHUH, em 1999, as citoceratinas coradas pelo AE1/ AE3 encontram-se no citoplasma, principalmente nas células basais e células suprabasais do epitélio, próximas ao limbo ou periferia da córnea, e as citoceratinas coradas pelo anticorpo AE5, encontram-se nas células epiteliais maduras ou

suprabasais da córnea. As figuras de 5 a 8 (ANEXOS), ilustram o padrão de coloração das lâminas submetidas ao estudo com os anticorpos AE1/AE3 e as figuras de 9 a 12 (ANEXOS), são referentes ao estudo realizado com o anticorpo AE5.

3.14- ANÁLISE DAS LÂMINAS CORADAS COM O BrdU

Utilizou-se a metodologia empregada em estudo realizado por SZERENYI

et al.(1994) e modificada durante a análise das lâminas do projeto piloto.

Nas imagens microscópicas os núcleos celulares corados com BrdU foram contados utilizando-se a seguinte metodologia:

- a) sob microscopia óptica (Microscópio Nykon – Labophat), com aumento de 4 vezes e utilizando-se uma caneta de retroprojektor, foram determinadas as duas extremidades da córnea;
- b) o tecido foi então demarcado em três partes iguais com régua milimetrada e delimitado por marcações da lâmina com caneta. Determinaram-se duas áreas periféricas e uma central da córnea;
- c) o tecido da lâmina foi comparado com o tecido embocado em parafina (com o fio de seda na região nasal) e as áreas periféricas das lâminas (nasal e temporal) foram identificadas;
- d) para análise microscópica foram escolhidos três campos em cada região, numa amostra aleatória, com a objetiva para aumento de 40 vezes;
- e) utilizando-se ocular milimetrada Kpl 8x – Carl Zeiss – Germany com objetiva de 40 vezes, contou-se o número de células coradas em cada campo milimetrado escolhido. Cada campo em objetiva de 40 vezes equivale a 0,25mm. A contagem de células, em três campos de cada região (0,75mm), englobou aproximadamente 90% da área total do epitélio da córnea;

f) para análise estatística foi utilizada a média aritmética dos resultados obtidos nos três campos de cada área (nasal, central e temporal);

Foram consideradas positivas as células íntegras, cilíndricas ou estratificadas e com núcleos intensamente corados (coloração marrom escuro). As células não intensamente coradas foram consideradas negativas (Figuras 13 a 16 – ANEXOS).

3.15- TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados foram apresentados descritivamente por médias aritméticas, desvios-padrão, medianas e valores mínimos e máximos.

Neste estudo, utilizou-se o modelo fatorial de análise de variância para o teste do efeito das drogas, em associação aos lotes em cada região da córnea de acordo com a técnica cirúrgica.

Em todos os testes estatísticos utilizou-se a medida descritiva **p** e adotou-se um nível de rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com um asterisco os valores significantes de 5% ou $p < 0,05$ (MONTGOMERY, 1991).

Os dados foram editados em Microsoft Excel, versão Windows 98.



4. **RESULTADOS**

4.1- ANÁLISE MACROSCÓPICA

Não foram observadas hiperemia ou secreção durante o período pré-operatório nos olhos dos animais. No período pós-operatório, observou-se leucoma no local da área desepitalizada de 1 olho de 1 animal referente ao lote A (coelho nº 5, que recebeu MMC e desepitelização parcial prévia à aplicação da MMC). Secreção amarelada em moderada quantidade foi observada em 3 olhos, sendo 2 coelhos do lote A (nº 5, que recebeu MMC e técnica de depitelização parcial prévia e nº 6, que recebeu SF e desepitelização parcial da córnea após a aplicação da solução) e 1 do lote B (coelho nº 24, que recebeu SF e desepitelização parcial antes da aplicação da solução). Este último, que recebeu solução de cloreto de sódio a 0,9% na superfície escleral, apresentou no mesmo olho uma área de afilamento escleral com abaulamento do tecido na área operada. Dois animais, do lote A, faleceram durante o acompanhamento pré-operatório e foram excluídos deste estudo.

4.2- ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

4.2.1- Reagentes AE1/AE3

As células consideradas positivas, ou marcadas pelos anticorpos primários AE1/AE3 ou AE5, apresentavam expressão de ceratinas de coloração citoplasmática marrom escura, presentes na camada basal e suprabasal do epitélio, independente do número de células.

Na análise do padrão de diferenciação das células epiteliais basais das regiões periféricas da córnea e central, observou-se que as células da periferia e da área central reagiram com os anticorpos AE1 / AE3 em todos os lotes avaliados nas duas técnicas cirúrgicas independentemente da droga utilizada. A tabela 1 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 1- Resultados da análise imunoistoquímica, da expressão de ceratinas de células epiteliais de córneas de coelhos, dos 3 lotes, com os anticorpos AE1/ AE3, distribuídos de acordo com a técnica cirúrgica (desepitelização parcial prévia= desepitelização da córnea antes da aplicação da solução; desepitelização parcial após = desepitelização da córnea após a aplicação da solução) e da solução aplicada (SF; MMC).

Lote	Solução	N° do animal	Técnica			
			desepitelização parcial prévia		desepitelização parcial após	
			periferia	central	periferia	central
A	SF	3	+	+	+	+
		6	+	+	+	+
		8	+	-	+	+
		17	+	-	perda	perda
		19	+	+	+	+
	MMC	4	+	+	+	+
		5	+	+	-	+
		7	+	+	+	+
		16	+	-	+	+
		18	+	-	+	+
B	SF	23	-	-	-	-
		24	-	-	+	+
		25	+	-	-	-
		26	+	+	+	+
	MMC	20	-	-	-	-
		21	+	+	+	+
		22	-	-	-	-
		27	+	-	+	-
C	SF	10	-	+	-	-
		12	-	-	+	-
		14	+	+	+	+
	MMC	9	+	-	+	-
		11	+	+	+	+
		13	-	-	-	-
		15	+	-	+	+

lote A – animais sacrificados no 4º dia de pós-operatório (PO); lote B – no 15º PO; lote C – 45º PO e 72 horas após nova intervenção para desepitelização central da córnea; MMC = mitomicina C; SF = solução de cloreto de sódio a 0,9%; Perda = material insuficiente, não avaliado; + = presença de expressão de ceratinas; - = ausência de expressão de ceratina.

As figuras 5, 6 e 7 (Anexos) ilustram o padrão de coloração das ceratinas do epitélio da córnea nos diferentes lotes. A figura 8 (Anexos) ilustra o controle negativo para estes anticorpos. Não houve diferença no padrão de marcação das ceratinas quando se utilizou MMC ou SF. Também não foi observada diferença significativa no padrão de coloração celular nas técnicas cirúrgicas utilizadas.

4.2.2- Reagente AE5

As células epiteliais da região central da córnea reagiram com o anticorpo AE5 nos animais dos lotes estudados (Tabela 2 e Figuras 9, 10 e 11 – Anexos). Para este anticorpo primário, o padrão de diferenciação celular foi semelhante nos animais que receberam solução fisiológica e mitomicina C, independente da técnica cirúrgica utilizada ou do lote analisado. A figura 12 (Anexos) ilustra o controle negativo para coloração com o anticorpo AE5.

Tabela 2- Resultados da análise imunoistoquímica, da expressão de ceratinas de células epiteliais de córneas de coelhos, dos 3 lotes, com o anticorpo AE5, distribuídos de acordo com a técnica cirúrgica (desepitelização parcial prévia= desepitelização da córnea antes da aplicação da solução; desepitelização parcial após = desepitelização da córnea após a aplicação da solução) e da solução aplicada (SF; MMC).

Lote	Solução	Nº do animal	Técnica			
			desepitelização parcial prévia		desepitelização parcial após	
			periferia	central	periferia	central
A	SF	3	+	+	+	+
		6	+	+	-	-
		8	+	+	+	+
		17	+	+	perda	perda
		19	+	+	+	+
	MMC	4	+	+	+	+
		5	+	+	+	+
		7	+	+	+	+
		16	+	+	+	+
		18	+	+	+	+
B	SF	23	+	+	+	+
		24	+	+	+	+
		25	+	+	-	+
		26	+	+	-	-
	MMC	20	+	+	+	+
		21	+	+	+	+
		22	-	-	+	+
		27	-	-	-	-
C	SF	10	-	+	-	+
		12	perda	perda	-	+
		14	-	+	-	+
	MMC	9	-	+	-	-
		11	-	+	-	+
		13	-	+	-	+
		15	-	+	-	+

lote A – animais sacrificados no 4º dia de pós-operatório (PO); lote B – no 15º PO; lote C – 44º PO e 72 horas após nova intervenção para desepitelização central da córnea; MMC = mitomicina C; SF = solução de cloreto de sódio a 0,9%; Perda = material insuficiente, não avaliado; + = presença de expressão de ceratinas; - = ausência de expressão de ceratina.

4.2.3- Reagente BrdU

As células consideradas positivas ou marcadas pela BrdU apresentavam-se arredondadas presentes na camada basal e suprabasal do epitélio e com núcleos de coloração escura, nos três lotes. As figuras 13, 14 e 15 (Anexos) ilustram o padrão de coloração celular nos diferentes lotes. A figura 16 (Anexos) ilustra o controle negativo (ausência de células marcadas pelo BrdU).

As médias, desvios-padrão, medianas, valores mínimos e máximos das células consideradas positivas para a reação com o anticorpo BrdU nas áreas periféricas (nasal e temporal) e central dos tecidos analisados nos diferentes lotes foram registradas nas tabelas de 3 a 14.

Tabela 3- Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região da córnea, nos animais do lote A, nos quais a solução empregada após desepitelização da região demarcada da córnea (desepitelização parcial prévia) foi o soro fisiológico.

Técnica	Soro fisiológico		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial prévia	1,00	2,00	6,00
	5,67	2,67	1,67
	0	12,33	33,00
	2,33	9,67	17,00
	3,67	2,67	1,67
Valor Mínimo	0,00	1,00	1,67
Valor Máximo	5,67	12,33	33,00
Mediana	1,00	2,67	17,00
Média ± desvio-padrão	1,80 ± 2,37	5,53 ± 5,11	15,07 ± 12,18

Tabela 4- Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região da córnea, nos animais do lote A, nos quais a desepitelização parcial da córnea foi realizada após a aplicação do soro fisiológico.

Técnica	Soro fisiológico		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial após solução	2,00	4,00	8,00
	1,33	6,67	5,67
	5,33	13,67	25,67
	3,00	8,00	10,00
	3,67	5,00	19,67
Valor Mínimo	1,33	4,00	5,67
Valor Máximo	5,33	13,67	25,67
Mediana	3,00	6,67	10,00
Média ± desvio-padrão	3,07 ± 1,55	7,47 ± 3,79	13,80 ± 8,51

Tabela 5- Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote A, nos quais a mitomicina C foi aplicada após a desepitelização da região demarcada da córnea (desepitelização parcial prévia).

Técnica	Mitomicina C		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial prévia	0	0	6,33
	0	0,00	8,33
	3,33	4,00	3,67
	4,67	15,00	14,67
	1,33	1,33	2,00
Valor Mínimo	0	0	1,67
Valor Máximo	4,67	15,00	14,67
Mediana	1,33	1,33	6,33
Média ± desvio-padrão	1,93 ± 2,14	3,80 ± 6,36	6,60 ± 5,33

Tabela 6- Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote A, nos quais a desepitelização parcial da córnea foi realizada após a aplicação da MMC.

Técnica	Mitomicina C		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial após a solução	1,00	4,67	20,33
	2,33	19,67	9,67
	3,67	5,00	19,67
	3,67	6,67	8,67
	6,00	3,00	1,33
Valor Mínimo	1,00	3,00	1,33
Valor Máximo	6,00	19,67	20,33
Mediana	3,33	4,67	8,67
Média ± desvio-padrão	3,27 ± 1,856	7,60 ± 6,88	8,73 ± 7,35

Tabela 7- Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote B, nos quais a solução empregada após desepitelização da região demarcada da córnea (desepitelização parcial prévia) foi o soro fisiológico.

Técnica	Soro fisiológico		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial prévia	3,67	3,33	0
	21,67	16,67	25,00
	1,67	1,67	4,67
	11,67	12,33	15,00
Valor Mínimo	1,67	1,67	0
Valor Máximo	21,67	16,67	25,00
Mediana	7,67	7,83	9,84
Média ± desvio-padrão	9,67 ± 9,09	8,50 ± 7,18	11,17 ± 11,15

Tabela 8- Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote B, nos quais a desepitelização parcial da córnea foi realizada após a aplicação do soro fisiológico.

Técnica	Soro fisiológico		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial após solução	8,33	7,67	12,33
	1,67	3,33	3,00
	4,67	5,00	3,00
	0,67	3,00	4,33
Valor Mínimo	0,67	3,00	3,00
Valor Máximo	8,33	7,67	12,33
Mediana	3,17	4,17	3,67
Média ± desvio-padrão	3,84 ± 3,45	4,75 ± 2,13	5,67 ± 4,49

Tabela 9- Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote B, nos quais a mitomicina C foi aplicada após a desepitelização da região demarcada da córnea (desepitelização parcial prévia).

Técnica	Mitomicina C		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial prévia	3,00	7,67	2,00
	3,00	2,00	2,00
	1,67	6,00	6,67
	2,67	1,67	1,67
Valor Mínimo	1,67	1,67	1,67
Valor Máximo	3,00	7,67	6,67
Mediana	2,84	4,00	2,00
Média ± desvio-padrão	2,59 ± 0,63	4,34 ± 2,97	3,09 ± 2,40

Tabela 10- Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote B, nos quais a desepitelização parcial da córnea foi realizada após a aplicação da MMC.

Técnica	Mitomicina C		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial após a solução	3,33	7,00	2,33
	5,00	6,00	2,33
	0,33	0,67	1,67
	2,00	2,00	0,67
Valor Mínimo	0,33	0,67	0,67
Valor Máximo	5,00	7,00	2,33
Mediana	2,67	4,00	2,00
Média ± desvio-padrão	2,67 ± 1,98	3,92 ± 3,06	1,75 ± 0,78

Tabela 11- Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote C, nos quais a solução empregada após desepitelização da região demarcada da córnea (desepitelização parcial prévia) foi o soro fisiológico.

Técnica	Soro fisiológico		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial prévia	7,00	21,67	11,67
	2,33	10,00	3,67
	2,00	15,33	21,67
Valor Mínimo	2,00	10,00	3,67
Valor Máximo	7,00	21,67	21,67
Mediana	2,33	15,33	11,67
Média ± desvio-padrão	3,78 ± 2,80	15,67 ± 5,84	12,34 ± 9,02

Tabela 12- Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote C nos quais, a desepitelização parcial da córnea foi realizada após a aplicação do soro fisiológico.

Técnica	Soro fisiológico		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial após a solução	2,67	8,33	3,67
	3,33	14,00	10,33
	5,33	12,67	6,33
Valor Mínimo	2,67	8,33	3,67
Valor Máximo	5,33	14,00	10,33
Mediana	3,33	12,67	6,33
Média ± desvio-padrão	3,78 ± 1,39	11,67 ± 2,97	6,78 ± 3,35

Tabela 13- Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote C, nos quais a mitomicina C foi aplicada após a desepitelização da região demarcada da córnea (desepitelização parcial prévia).

Técnica	Mitomicina C		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial prévia	2,67	8,33	0,67
	6,67	5,67	4,33
	1,67	6,00	18,33
	6,67	4,67	0
Valor Mínimo	1,67	4,67	0
Valor Máximo	6,67	8,33	18,33
Mediana	4,67	5,84	2,50
Média ± desvio-padrão	4,42 ± 2,63	6,17 ± 1,55	5,83 ± 8,55

Tabela 14- Valores das medianas, médias e desvios-padrão das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região nos animais do lote

C, nos quais a desepitelização parcial da córnea foi realizada após a aplicação da MMC.

Técnica	Mitomicina C		
	nasal	central	temporal
	1	3,67	2
Desepitelização parcial	0,33	1,67	2,33
após a solução	19,67	4,67	8
	14	0	3
Valor Mínimo	0,33	0	0
Valor Máximo	19,67	4,67	8,00
Mediana	7,50	2,67	1,67
Média $\pm$ desvio-padrão	8,75 $\pm$ 9,62	2,50 $\pm$ 2,08	2,83 $\pm$ 3,54

Os anexos de 3 a 8, apresentam os resultados obtidos pela contagem de células em cada campo das diferentes áreas, nas lâminas coradas com o reagente BrdU, correspondentes aos animais dos 3 lotes (A, B e C) e que receberam SF ou MMC.

O estudo estatístico dos resultados das contagens de células realizadas nessas lâminas está descrito nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15- Modelo fatorial para análise estatística considerando como fatores: drogas utilizadas (MMC e SF) e lotes (A, B e C). Estudo considerando a proliferação celular em toda a córnea e em cada região específica, após a técnica de desepitelização parcial prévia = desepitelização parcial da córnea antes da aplicação da solução.

Técnica	Região da córnea	Fatores	Valor F	Pr>F	Significância
Desepitelização parcial prévia	Nasal+Central + Temporal	Lotes	0,48	0,5067	n.s.
		Droga	10,00	0,0023	*
		Lotes X Droga	0,36	0,6993	n.s.
	Nasal	Lotes	2,37	0,1210	n.s.
		Droga	1,56	0,2266	n.s.
		Lotes X Droga	2,19	0,1399	n.s.
	Central	Lotes	2,95	0,0767	n.s.
		Droga	5,81	0,0263	*
		Lotes X Droga	1,13	0,3447	n.s.
	Temporal	Lotes	0,39	0,6803	n.s.
		Droga	4,60	0,0451	*
		Lotes X Droga	0,03	0,9737	n.s.

lote A – animais sacrificados no 4º dia de pós-operatório (PO); lote B – no 15º PO; lote C – 45º PO e 72 horas após nova intervenção para desepitelização central da córnea;

* : significativo ao nível de 5%;

n.s. : não significativo

Neste modelo, para esta técnica, existem evidências estatísticas de diferença para o fator droga, entre SF e MMC, nas regiões central e temporal e na associação de ambas as regiões ($p < 0,05$), ou seja, existem evidências estatísticas que, para esta técnica, a droga utilizada afetou a quantidade de células medidas, nas regiões citadas. Em relação à interação lote e droga, também não houve diferença estatisticamente significativa, ou seja não existem evidências estatísticas de associação entre lote e droga. A diferença estatística da quantidade de células é devido ao fator droga, e não ao fator lote.

Tabela 16- Modelo fatorial para análise estatística considerando como fatores: drogas utilizadas (MMC e SF) e lotes (A, B e C). Estudo considerando a proliferação celular em toda a córnea e em cada região específica, na técnica de desepitelização parcial da córnea após a aplicação da solução.

Técnica	Região da córnea	Fatores	Valor F	Pr>F	Significância
Desepitelização parcial após a solução	Nasal+Central +Temporal	Lotes A e B	3,19	0,0480	*
		Droga	2,90	0,0955	n.s.
		Lotes X Droga	0,07	0,9305	n.s.
	Nasal	Lotes	1,25	0,3078	n.s.
		Droga	0,58	0,4546	n.s.
		Lotes X Droga	1,03	0,3775	n.s.
	Central	Lotes	1,50	0,2493	n.s.
		Droga	3,90	0,0629	n.s.
		Lotes X Droga	2,94	0,0773	n.s.
	Temporal	Lotes A e B	4,57	0,0240	*
		Droga	3,41	0,0804	n.s.
		Lotes X Droga	0,03	0,9711	n.s.

lote A – animais sacrificados no 4º dia de pós-operatório (PO); lote B – no 15º PO; lote C – 45º PO e 72 horas após nova intervenção para desepitelização central da córnea

* : significativo ao nível de 5%;

n.s. : não significativo

Neste modelo, para esta técnica, não existem evidências estatísticas de diferença para o fator droga entre SF e MMC. Existem evidências estatísticas de diferença entre os lotes, na região temporal e na associação de ambas as regiões ($p < 0,05$), ou seja, existem evidências estatísticas que, para esta técnica, o lote A e o lote B são estatisticamente diferentes na quantidade de células medidas nas regiões citadas. O lote C foi testado e não apresentou diferença estatística. A interação dos fatores droga e lote, foi testada e não apresentou diferença estatística.



5. DISCUSSÃO

Os efeitos das drogas oftálmicas usadas topicamente sobre a córnea podem influenciar na cinética celular do epitélio (JABBUR et al., 1994; CRESTA, 2002).

Neste estudo, no qual se buscou identificar eventuais efeitos da MMC em baixa dose sobre a proliferação celular, optou-se por um modelo experimental que utilizou coelhos da raça Nova Zelândia. Os coelhos foram os animais escolhidos, por razões econômicas e pela semelhança do tecido da córnea com o tecido humano. Possuem um rápido *turnover* das células epiteliais, e são os animais mais utilizados para estudos referentes ao desenvolvimento do epitélio. Uma importante vantagem desse modelo experimental reside na grande semelhança que existe entre o padrão de ceratinas humanas e de coelhos (HANNA e O' BRIEN, 1960; SCHERMER et al., 1986; HADDAD, 2000).

Os coelhos da raça Nova Zelândia são caracterizados por sua docilidade e podem ser adquiridos com peso e tamanho suficientes para permanecer em gaiolas individuais ou aos pares. As fêmeas são mais dóceis, e foram as escolhidas pelo manuseio ainda mais fácil (HIRST et al., 1981; MILLER et al., 1989).

A MMC, droga utilizada em diversos procedimentos oftalmológicos como terapia adjuvante, atua como inibidor da proliferação celular e tem sido vinculada ao surgimento de complicações durante o período pós-operatório, como erosões de córnea, hiperemias conjuntivais, blefaroespasmos, afilamentos de córnea e esclera e perfurações (RUBINFELD et al., 1992; CARDILLO et al., 1995a).

No presente estudo, não foram verificadas complicações como secreções, hiperemia, afilamentos de córnea e/ou esclera atribuídas ao uso da MMC a 0,02% aplicada em dose única por 3 minutos na região episcleral. Os mesmos achados foram observados por SAMPAIO et al.(1995), quando instilou MMC a 0,02% e 0,04% em olhos de ratas.

A função do epitélio da córnea depende da produção contínua de novas células epiteliais, de sua diferenciação e eventual descamação da superfície. O epitélio deve estar preparado para reparar defeitos rapidamente. Para desenvolver

suas funções de forma adequada, necessita de uma coordenação efetiva entre os fatores que controlam a proliferação das células epiteliais basais e a diferenciação das mesmas, que migram até as camadas mais superficiais. Anormalidades nesse mecanismo permitem o surgimento de defeitos epiteliais persistentes, afilamentos, defeitos de reepitelização (LEMP e MATHERS, 1991).

Em 1983, THOFT e FRIEND formularam a hipótese denominada de X,Y,Z onde a preservação do número de células no epitélio da córnea é resultado de uma adição de novas células basais pela divisão celular (X), da migração centrípeta de novas células (Y), e o acúmulo destas é balanceado pela perda de células superficiais (Z). A córnea normal obedece então à equação $X+Y=Z$. Os defeitos epiteliais são causados pelo decréscimo da migração celular e/ou da proliferação, como também o aumento da descamação.

A localização das células germinativas epiteliais no limbo foi demonstrada em 1991 por HUANG e TSENG, que, ao retirarem a porção límbica, relataram a conseqüente diminuição da capacidade regenerativa do epitélio da córnea.

Ainda é desconhecido o mecanismo regulador do número de células basais que penetram na córnea provindas das células germinativas situadas no limbo e que é responsável pelo controle da proliferação das células basais, sua diferenciação e pela sua descamação (DAVID et al., 1996).

Os relatos da literatura, enfatizando que a MMC é um potente agente antineoplásico capaz de inibir a proliferação celular e desta forma colaborar para o sucesso de diversos procedimentos oftálmicos, o baixo custo e a facilidade na manipulação, justificam a sua utilização e a necessidade de melhores conhecimentos relativos às possíveis complicações droga-dependentes (KUNITOMO e MORI, 1963; CHEN, 1983; SINGH et al., 1988; CARDILLO et al., 1995a).

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 da córnea. Em 1992, ANDO et al. relataram que os resultados observados *in vivo* indicam que a MMC inibe a proliferação das células epiteliais da córnea de coelhos, e este efeito inibitório é dependente da dose utilizada, sendo que os limites da dose variam de 0,0016% a 0,2%, e a DI50 foi estimada ser 0,06%.

Em 1992, KAWASE et al. mediram a concentração da MMC na conjuntiva, esclera e humor aquoso de coelhos após injeções subconjuntivais cujas concentrações da droga variavam de 0,002 a 0,2mg/ml. Estes autores observaram que a MMC apresenta uma meia-vida de 0,18 até 0,48 hora. A concentração da mesma foi reduzida para 1/15 quando a conjuntiva e a esclera foram irrigadas com 200ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%, porém, a meia-vida da droga permanecia inalterada. As análises foram realizadas com a técnica de cromatografia líquida de alta performance em 0,5, 1, 2, 3, 6, 24, 72 e 168 horas após a aplicação da MMC. Estes resultados reforçam que a droga desaparece rapidamente dos tecidos e a irrigação diminui significativamente a concentração da MMC.

A irrigação é um procedimento necessário para a retirada do excesso da solução do local onde foi aplicada. Essa irrigação permite que a droga (SF ou MMC para as condições desse estudo) entre em contato com outras células da superfície ocular, o que poderia influenciá-las. Neste estudo, não foi observada interferência na proliferação das células da região nasal da córnea. A irrigação da área episcleral que recebeu MMC com 100ml de SF foi suficiente para não permitir interferência na proliferação celular da área nasal da córnea (Tabelas 15 e 16), sugerindo que a MMC na concentração utilizada no presente estudo não influenciou sobre o tecido epitelial da córnea íntegro.

Estudos realizados em animais utilizaram concentrações de MMC a 0,05, 0,2 e 1,0mg/ml, aplicados na esclera por 5 minutos, e observaram a diminuição da produção de humor aquoso no epitélio ciliar de coelhos, sendo esse efeito dose-dependente (MIETZ et al., 1994). CARDILLO et al. (1995d), demonstraram que há diminuição dos índices de recidivas de pterígios após aplicação única intra-operatória de MMC na

concentração de 0,02% por 3 minutos e sugeriram que, uma vez decidido pelo uso da MMC como terapia adjuvante, deve-se evitar a técnica de esclera nua durante a ressecção de pterígio, bem como a excessiva cauterização e delaminação da conjuntiva e esclera, pois estes fatores podem estar relacionados com o aumento de complicações pós-operatórias.

A evidência que a administração de MMC tópica iniciando-se no primeiro dia de pós-operatório pode ser insuficiente para penetrar o epitélio e a fibrina do processo de cicatrização do tecido operado, encorajou o uso de uma aplicação única de MMC durante a cirurgia de ressecção de pterígio (DUSHKU e REID, 1994).

Devido aos relatos da literatura, neste modelo experimental, optou-se pela utilização de uma única aplicação de MMC na concentração de 0,02% por 3 minutos durante o momento cirúrgico, seguido da irrigação do olho operado com 100ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%. Como a técnica cirúrgica pode influenciar no aumento dos índices de complicações, a análise da proliferação e diferenciação celular, com a preservação do epitélio e com desepitelização parcial da córnea antes da aplicação da MMC tornou-se importante.

Os estudos sobre o potencial regenerador das células epiteliais da córnea, para a reparação rápida do tecido, sugerem que o processo de regeneração pode ocorrer de maneira centrípeta pela migração das células germinativas provenientes do limbo ou de forma circunferencial por deslizamento das células adjacentes às bordas da área desepitelizada (HADDAD, 2000; DUA et al., 2001). Mesmo com a rapidez do potencial regenerador, houve diferença significativa na proliferação celular das regiões central e periférica temporal dos animais que receberam SF ou MMC avaliados no 4º, 15º e 45º dias de pós-operatório quando a técnica de desepitelização parcial prévia da córnea foi aplicada (Tabela 15). Esse fato sugere que a utilização da técnica cirúrgica que preserva a córnea durante a aplicação da MMC pode ser um fator importante durante a cicatrização no período pós-operatório.

A inibição da proliferação celular observada nas fases consideradas tardias

(15 e 45 dias de pós-operatório) sugere que a mitomicina C tem efeito inibidor prolongado sobre as células epiteliais da córnea de coelhos (Tabela 15).

Mediante um defeito epitelial as células sofrem a influência de interleucinas e fatores de crescimento que exacerbam o mecanismo fisiológico de proliferação celular (WILSON et al., 1996). A superfície lesada é recoberta de fibronectina, fibrinogênio e fibrina, importantes na adesão celular e leucócitos polimorfonucleares trazidos pelo filme lacrimal (PFISTER, 1975; FUJIKAWA et al., 1981). A fase linear é um processo ativo com a utilização de energia proveniente do metabolismo do glicogênio permitindo a migração das células epiteliais sobre a área da lesão. O defeito é recoberto, inicialmente, por uma única camada celular e principalmente por células basais ou suprabasais (HANNA, 1966; CINTRON et al., 1981; DUA et al., 1994). A migração de células é controlada por mecanismos inibitórios desencadeados pelo contato entre as membranas celulares após recobrimento total da área desepitelizada (CINTRON et al., 1981) e é um evento complementar ao de proliferação celular (DUA et al., 1994).

A rapidez do processo de proliferação depende diretamente da presença ou não de lesão da membrana basal. Na vigência de lesão da membrana a finalização do processo de proliferação celular, ou seja, da presença de hemidesmosomos, pode durar de 6 a 8 semanas em contraste aos 7 dias de finalização, quando a membrana basal está preservada (KHODADOUST et al., 1968).

Neste modelo experimental, a desepitelização central realizada nos olhos dos animais do lote C estimulou a hiperproliferação e permitiu a avaliação da proliferação e diferenciação celular na fase considerada tardia, ou seja, após 45 dias de aplicação de solução fisiológica (grupo controle) e MMC, potencial inibidor da proliferação celular (Tabelas 11 a 14).

O estudo da cinética do epitélio da córnea é importante para a compreensão de uma grande variedade de processos fisiológicos e patológicos. Os

métodos imunoistoquímicos e histoquímicos, cada vez mais difundidos entre os laboratórios de patologia e com melhores resultados à medida que as técnicas vão se aprimorando, já se encontram entre os mais úteis e usados para avaliação da proliferação celular (MELLO, 1997; CRESTA, 2002).

Nesta investigação, além dos anticorpos AE1/AE3, marcadores de células em proliferação, empregou-se também o AE5, um anticorpo monoclonal, altamente específico para a ceratina de 64kd, considerado marcador específico da célula epitelial da córnea diferenciada. Dessa forma observou-se a presença de células diferenciadas, ou seja, que apresentavam ceratinas que reagem com o anticorpo monoclonal AE5, em todos os lotes estudados (Tabelas 1 e 2).

HOLZCHUH, em 1999, observou que após instilação de colírio de MMC a 0,02% ou água destilada, as células do epitélio íntegro de coelhos apresentaram um padrão de diferenciação quando marcadas pelos anticorpos AE1 e AE5, onde as células do limbo coravam na presença do anticorpo AE1 e as células centrais coravam com o AE5 em todos os lotes avaliados.

Nesta pesquisa, nos animais sacrificados no 4º e 15º dias de pós-operatório observou-se a presença de células basais coradas com o anticorpo monoclonal AE5 na periferia da córnea (Tabela 2). Em todos os lotes estudados, não houve diferença entre o padrão de diferenciação observado nos animais que receberam SF (controle) ou MMC, e, portanto, a MMC não interferiu no padrão de diferenciação celular independente da técnica cirúrgica utilizada.

Em 1986, SCHERMER et al., usaram o AE5 em estudos de cinética das células epiteliais e demonstraram que em colônias de epitélio da córnea as ceratinas de 55/64kd estão localizadas suprabasalmente, bem como na região límbica. Em contraste, a resposta das células basais do epitélio da região central da córnea foi positiva quanto à presença de ceratina 64kd. Esses achados sugerem que as células basais do limbo estão em um estado mais avançado de diferenciação em relação às células germinativas. Os ceratócitos das camadas basais presentes em cultura de tecidos da córnea podem corar com o anticorpo monoclonal AE5,

sugerindo que a localização suprabasal não é um pré-requisito para a expressão das ceratinas de 64K.

Além dos anticorpos monoclonais, outras técnicas foram descritas para o estudo da cinética de proliferação celular. Uma técnica bastante aceita emprega substâncias que são anexadas à estrutura do DNA durante a fase S de replicação. Essas substâncias podem ser radioativas como a timidina tritiada ([³H]TdR) ou atuarem como substituto da timidina, a exemplo da 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU). A BrdU é incorporada nas células do DNA substituindo a timidina, durante a fase S de replicação do DNA.

Em 1985, SHAPIRO et al. utilizaram a timidina tritiada ([³H]TdR) para estudar o padrão de mitoses do epitélio de coelhos e eventual toxicidade relacionada ao uso de 5-fluoracil (5-FU), uma droga antimetabólica capaz de inibir a proliferação celular. O 5-FU é utilizado em procedimentos oftalmológicos; porém, por apresentar menor eficácia e maior índice de complicações, é usado com menor frequência do que a MMC. A [³H]TdR também foi utilizada para a determinação do ritmo circadiano das mitoses em córnea de ratos, além de avaliações do endotélio da córnea.

Em 1982, GRATZNER desenvolveu e testou a BrdU para o estudo da cinética celular. O autor sugeriu que a BrdU poderia ser um reagente alternativo, eficiente, de fácil e rápido manuseio para evidenciar o processo de divisão celular do epitélio da córnea. Na década de 90 RASKA et al. (1991) e SZERENYI et al. (1994) relataram que o tempo de exposição à BrdU influencia as taxas de marcação sendo que o intervalo de tempo ideal dependeria da duração do ciclo celular.

Nesse estudo, a BrdU foi escolhida pela facilidade de manuseio, por não ser um agente radioativo e por ser eficaz na determinação das células em proliferação. Foi aplicada em injeção endovenosa, 24 horas antes do sacrifício dos animais, abrangendo assim o ritmo circadiano de mitoses das células epiteliais cujo pico de mitose é de 9 horas, como descrito por HAASKJOLD et al., em 1989. O sacrifício dos animais 24 horas após a aplicação da BrdU permitiu sua

incorporação ao DNA celular e posterior quantificação das células da córnea durante as análises laboratoriais dos tecidos.

Em 1994, SZERENYI et al. estudaram o epitélio da córnea de coelhos com o marcador BrdU aplicado em injeção endovenosa 15 horas antes da retirada dos tecidos para análise. Os autores encontraram no grupo com o epitélio normal uma porcentagem média de células marcadas de $4,1\% \pm 2,9\%$ na área central da córnea. A leitura obtida sob microscopia óptica considerou o número de células coradas em relação ao total de células epiteliais presentes em cada campo. No 3º dia após a realização de um defeito epitelial central de 6mm na córnea, o número de células coradas aumentou para $129,3 \pm 34,0$, no 6º dia diminuiu para $34,3 \pm 14,1$ e $10,5 \pm 1,9$ no 10º dia. Valores semelhantes àqueles encontrados no epitélio normal ($9,2 \pm 5,8$) foram observados no 10º dia após a desepitelização.

No presente estudo a média e desvio-padrão do número de células marcadas na região central da córnea após aplicação de solução fisiológica para a técnica de desepitelização parcial prévia foi de $15,67 \pm 5,84$, no lote C (indução da proliferação celular pela desepitelização central da córnea), $5,53 \pm 5,11$ em 4 dias (lote A) e $8,50 \pm 7,18$ com 15 dias (Tabelas 11, 3 e 7). Quando se utilizou a técnica de desepitelização parcial da córnea após a aplicação de SF, as médias foram de $11,67 \pm 2,97$ para o lote C, de $7,47 \pm 3,79$ em 4 dias (lote A) e $4,75 \pm 2,13$ para 15 dias (lote B), valores descritos nas tabelas 4, 8 e 12.

As diferenças entre os valores obtidos neste estudo ao analisar as células coradas com o reagente BrdU com os descritos por outros autores podem estar relacionadas à diferente padronização na leitura das lâminas, no tamanho da área desepitelizada, no tempo de ação da BrdU (sacrifício do animal após aplicação do reagente), técnica ou profundidade da desepitelização da córnea (mecânica ou química com n-heptanol, profunda ou superficial, com ou sem a lesão da membrana basal), e diferenças entre as espécies estudadas (ZAGON et al., 2000).

Segundo HADDAD (2000), as células que iniciam o processo de mitose na córnea de coelhos estão restritas à camada basal do epitélio. O número de mitoses das células que permanecem na camada basal é variável, e as células, que migram, chegam na camada mais superficial do epitélio entre 14 e 21 dias. Este período é variável entre as diferentes espécies de animais, ou da metodologia aplicada em cada estudo.

No presente estudo foi então determinado o sacrifício dos animais em 15 dias de pós-operatório e considerada uma fase tardia, onde as células epiteliais das camadas mais profundas foram substituídas por outras provenientes do limbo que migraram para a camada basal. A mitomicina C interferiu na proliferação celular das células epiteliais da córnea nas regiões temporal e central em 4, 15 e 45 dias de pós-operatório apenas na técnica de desepitelização parcial prévia à aplicação de MMC. Não houve variação estatística entre as drogas quando a técnica de desepitelização parcial da córnea após a aplicação de MMC foi utilizada. Esses resultados sugerem que a MMC atuou no local onde foi aplicada, ou seja, nas regiões episcleral e límbica. A inibição celular observada nas regiões temporal e central sugerem que a MMC influencia significativamente as células expostas após defeito epitelial e não influencia as células com o epitélio íntegro.

MATTAR et al., em 1994, observaram o retardo da cicatrização de defeitos epiteliais realizados em córnea de coelhos quando a MMC a 0,02% ou 0,04% era aplicada por 5 minutos na área desepitelizada, e, em 1995, MATTAR et al. observaram que após desepitelização central da córnea de coelhos e aplicação episcleral de MMC a 0,04%, não havia retardo na cicatrização do defeito epitelial, sugerindo que a ação da droga ficava restrita ao local da aplicação e em células lesadas ou expostas diretamente à droga.

O presente estudo, assim como os resultados obtidos por ANDO et al. (1992), MATTAR et al. (1995), MIETZ et al. (1996), HOLZCHUH, et al. (1997), HOLZCHUH, (1999), sugere que a MMC por ser um agente antimitótico pode interferir no processo de cicatrização celular. Sua aplicação, portanto, deve ser controlada, minimizando o contato com a córnea e com os demais tecidos oculares.

A importância dos cuidados no manuseio e aplicação da droga, além da necessidade de determinação da concentração mínima suficiente para a inibição da proliferação celular, é fundamental para o êxito cirúrgico ou clínico e para a diminuição dos índices de complicações droga-relacionadas.



6. *CONCLUSÕES*

A mitomicina C na concentração de 0,02%, embebida em esponja de celulose, em aplicação única por 3 minutos na região episcleral temporal dos olhos de coelhos, e as avaliações realizadas no 4º, 15º e 45º dias de pós-operatório, nas condições deste estudo, permitiu concluir que:

- 1 – as complicações clínicas observadas nos olhos dos animais durante o período pós-operatório, não podem ser atribuídas à MMC;
- 2 – a presença de células diferenciadas em todos os tempos de pós-operatório avaliados, sugere que a MMC não interfere no processo de maturação celular;
- 3 – a MMC inibiu a proliferação celular na região central e temporal quando se utilizou a técnica de desepitelização parcial prévia à aplicação da MMC em todas as fases analisadas da cinética do epitélio da córnea;
- 4 – a MMC, que poderia ter restado após a irrigação do local de sua aplicação com soro fisiológico, não inibiu a proliferação celular de outras regiões da córnea de epitélio íntegro, com as quais entrou em contato, durante o emprego das duas técnicas cirúrgicas. Estes dados sugerem que a atuação da MMC permanece restrita ao local da aplicação e às células expostas após desepitelização;
- 5 – a permanência do efeito da mitomicina C no epitélio da córnea na avaliação realizada aos 45 dias após a aplicação única, sugere que a droga tem um efeito prolongado e sinaliza para a necessidade de estudos objetivando melhor avaliar o potencial tóxico da droga.



ALVES, M. R.; CARDILLO, J. A.; NETO, A. T.; JOSÉ, N. K.; AMBRÓSIO, L. E.; SERPA, J. F. Efeitos locais do colírio de mitomicina C na sensibilidade tátil corneana, no filme lacrimal e no epitélio córneo-conjuntival de olhos operados de pterígio. **Arq Bras Oftal**, **58**:112-140, 1995.

ALVES, M. R.; KARA JOSÉ, N. Influência do uso tópico de mitomicina C na reparação de defeito epitelial corneano em coelhos. **Arq Bras Oftalmol**, **59**:77-82, 1996.

ALVES, M. R.; BIGNARDI, T. H. Efeito do uso tópico de mitomicina C na superfície conjuntival de coelhos. **Rev Bras Oftalmol**, **56**:387-393, 1997.

ALVES, M. R.; KARA JOSÉ, N. Reepitelização. In: BELFORT Jr., R.; KARA JOSÉ, N., ed. **Córnea:clínica – cirúrgica**. São Paulo, Roca, 1997. p27-32.

ALVES, M.; ROSA S. F.; GADIOLI, D.; RASKIN E.; RASKIN D. G.; ALVES, M. R. Mitomicina C subconjuntival como adjuvante no tratamento cirúrgico de pterígio: resultados preliminares. **Rev Bras Oftalmol**, **62**:35-40, 2003.

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**: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.

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, 1980, St Louis **Transactions of New Orleans Academy of Ophthalmology**, 1980, St Louis, Mosby, 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 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. Agentes antiproliferativos e drogas usadas na imunossupressão. In: GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F.; **As bases farmacológicas da terapêutica**. 7ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1987, p.817-56.

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.; **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9ed., México, McGraw-Hill, 1996, p.903-8.

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**:1949-52, 1995a.

CARDILLO, J. A.; KARA JOSÉ, N.; ALVES, M. R.; POTÉRIO, M. B.; COELHO, R. P.; AMBRÓSIO, L. E. Instilação de colírio de mitomicina C no pós-operatório do pterígio primário. **Arq Bras Oftal**, **58**:138-40, 1995b.

CARDILLO, J. A.; ALVES, M. R.; TRANJAN NETO A.; KARA JOSÉ, N.; POTÉRIO, M. B.; CAMARGO J. C. F. Efeitos do uso intra-operatório da mitomicina C na sensibilidade tátil corneana, no filme lacrimal e no epitélio córneoconjuntival de olhos operados de pterígio . **Rev Bras Oftalmol**, **54**:15-8, 1995c.

CARDILLO, J. A.; ALVES, M. R.; TRANJAN NETO A.; SERPA, J. F.; AMBRÓSIO, L. E. Uso tópico pós-operatório versus aplicação intra-operatória de mitomicina C a 0,02% na prevenção de recidivas pós-operatórias do pterígio primário. **Arq Bras Oftal**, **58**:413-15, 1995d.

CHABNER, B. A.; ALEGRA, C. J.; CURT, G. A.; CALABRESI, P. Agentes antineoplásicos. In: GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9ed., México, McGraw-Hill, 1996. p.909-49.

CHAR, D. H.; HUHTA, K.; WALDMAN, F. DNA cell cycle studies in uveal melanoma. **Am J Ophthalmol**, **107**:65-72, 1989.

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, W. Y. W.; TSENG, S. C. G. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, **31**:1301, 1990.

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.

CHEW, S. J.; BEUERMEN, R. W.; KAUFMAN, H. E. In vivo assesment of corneal stromal toxicity by tandem scanning confocal microscopy. **Lens Eye Toxic Res**, **9**:275-92, 1992.

CINTRON, C.; KUBLIN, C. L.; COVINGTON, H. Quantitative studies of corneal epithelial wound healing in rabbits. **Curr Eye Res**, **1**(9):507-16, 1981.

COOPER, D.; SCHERMER, A.; SUN, T. T. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins:strategies, applications and limitations. **Lab Invest**, **52**:243-56, 1985.

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.; WILSON, R. P.; MOSTER, M. R.; SCHMIDT, C. M.; GANDHAM, S. Hypotony maculopathy following the use of topical mitomycin C in glaucoma filtration surgery. **Ophthalmic Surg**, **24**:389-94, 1993b.

COSTA, V. P.; COMEGNO, P. E.; VASCONCELOS, J. P.; MALTA, R. F.; JOSÉ, N. K. Low-dose mitomycin C trabeculectomy in patients with advanced glaucoma. **J Glaucoma**, **5**: 193-9, 1996.

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.

CRESTA, F. B. **Avaliação da cinética do epitélio corneano de coelhas com marcadores de proliferação celular.** 2002. 87f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CROOKE, S. T.; BRADNER, W. T. Mitomycin C: a review. **Cancer Treat Rev**, **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.

DANJO, S.; FRIEND, J.; THOFT, R. A. Conjunctival epithelium in healing of corneal epithelial wounds. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, **28**:1445-9, 1987.

DAVID, C.; BEE, B. E.; BARRY, R. M. Cell lineage and the differentiation of corneal epithelial cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, **37**: 1815-25, 1996.

DAVIDSON, P. M.; CAMPELL, I. L.; OXBROW, L.; HUTSON, J. M., HARRISON, L. C. Pancreatic beta cell proliferation in rabbits demonstrated by bromodeoxyuridine labeling. **Pancreas**, **4**:594-600, 1989.

DOHLMAN, C. H. The function of the cornea epithelium in health and disease. **Invest Ophthalmol**, **10**:383-407, 1971.

DOLBEARE, F.; BEISKER, W.; PALLAVICINI, M. G.; VANDERLAAN, M.; GRAY, J. W. Cytochemistry for bromodeoxyuridine/DNA analysis: stoichiometry and sensitivity. **Cytometry**, **6**:521-530, 1985.

DONNENFELD, E. C.; PERRY, H. D.; WALLERSTEIN, A.; CARONIA, R. M.; KANELLOPOULOS, A. J.; SFORJA, P. D.; DÁVERSA, 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. **Br J Ophthalmol**, **78**:401-8, 1994.

DUA H. S.; KING, A. J.; JOSEPH, A. A new classification of ocular surface burns. **Br J Ophthalmol** **85**(11):1379-83, 2001.

- DUSHKU, N.; REID, T. W. Immunohistochemical evidence that human pterygia originates from an invasion of vimentin-expressing altered limbal epithelial basal cells. **Curr Eye Res**, **13**:473-81, 1994.
- FINGER, P. T.; McCORNICK, S. A. Topical mitomycin C chemotherapy for conjunctival melanoma. **Ophthalmology**, **101(suppl)**:109-110, 1994.
- FRANKE, W. W.; SCHMID, E; OSBORN, M.; WEBER, K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. **Proc Natl Acad Sci Usa** , **75**:5034-38, 1978.
- 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.
- 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.; 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.
- FUCHS, E.; HANUKOGLU, I.; MARCHUK, D.; GRACE, M. P.; KIM, K. H. The nature and significance of differential keratin gene expression. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **455**:436-50, 1985.
- FUJIKAWA, L. S.; FOSTER, C. S.; HARRIST, T. J.; LANIGAN, J. M.; COLVIN, R.B. Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. **Lab Invest**, **45(2)**:120-9, 1981
- GRATZNER, H. G. Monoclonal antibody to 5-bromo-and-5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. **Science**, **218**:474-475, 1982.

HAASKJOLD, E.; REFSUM, H.; REFSUM, S. B.; BJERKNES, R. Cell kinetics of the rat corneal epithelium. **APMIS**, **100** (12):1123-8, 1992.

HADDAD, A. Renewal of the rabbit corneal epithelium as investigated by autoradiography after intravitreal injection of 3H-thymidine. **Cornea**, **19**: 378-83, 2000.

HANNA, C. Effect of IDU on DNA synthesis during corneal wound healing. **Am J Ophthalmol**, **61**:279-82, 1966.

HANNA, C.; O'BRIEN, J. E. Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea. **Arch Ophthalmol**, **64**:536-39, 1960.

HATA, T.; SANO, R.; SUGAWARA, R.; MATSUMAE, A.; KANAMORI, K.; SHIMA, T. et al. 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.

HAYASAKA, S.; NODA, S.; YAMAMOTO, Y.; SETOGAWA, T. Postoperative instillation of low-dose mitomycin C in the treatment of primary pterygium. **Am J Ophthalmol**, **106**(6):715-8, 1988.

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.

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**(6):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. **Efeitos do uso tópico da mitomicina C no epitélio corneano de coelhos.** 1999. 119f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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.

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.

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.

KAWASE, K.; MATSUSHITA, H.; YAMAMOTO, T.; KITAZAWA, Y. Mitomycin concentration in rabbit and human ocular tissues after topical administration. **Ophthalmology**, **99**:203-7, 1992.

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-minutes 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-minutes. exposures to fluorouracil and mitomycin C. **Arch Ophthalmol**, **111**:263-7, 1993.

KHODADOUST, A. A., SILVERSTEIN, A. M.; KENYON, D. R.; DOWLING, J. E. Adhesion of regenerating corneal epithelium. The role of basement membrane. **Am J Ophthalmol**, **65**(3):339-48, 1968.

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.

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, Report IV. 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**, **32** (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.
- LEMP, M. A.; MATHERS, W. D. Renewal of the cornea epithelium. **CLAO J**, **17**: 258-66, 1991.
- MANDIA JÚNIOR, C.; RODRIGUES, M. L. V. Trabeculectomia com mitomicina-C no tratamento de glaucomas refratários:avaliação dos resultados de 108 casos. **Arq Bras Oftal**, **65**:509-14, 2002.
- MATTAR, D. B. **Contribuição ao estudo dos efeitos do uso tópico da mitomicina C na regeneração do epitélio corneano em coelhas. Estudo experimental.** 1994. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 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.; ALVES, M. R.; SILVA, M. H. T.; KARA-JOSÉ, N. Estudo da influência da aplicação subconjuntival da mitomicina C na reparação de defeito epitélio 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.
- MIETZ, H.; ADDICKS, K.; DIESTELHORST, M.; KRIEGLSTEIN, G. K. Extraocular application of mitomycin C in rabbit model: cytotoxic effects on the ciliary body and epithelium. **Ophthalmic Surg**, **25**:240-4, 1994.
- MIETZ, H.; ADDICKS, K.; BLOCH, W.; KRIEGLSTEIN, G. K. Long-term intraocular toxic effects of topical mitomycin C in rabbits. **J Glaucoma**, **5**(5):325-33, 1996.

- MILANI, J. A. **Contribuição ao estudo dos efeitos do uso tópico da ciprofloxacina na regeneração do epitélio corneano de coelhos.** 1992. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 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**:350-7, 1989.
- MINGUINI, N.; MONTEIRO de CARVALHO, K. M.; AKAISHI, P. M.; De LUCA, I.M. Histologic effect of mitomycin C on strabismus surgery in the rabbit. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, **41**:3399-401, 2000.
- MOLL, R.; FRANKE, W. W.; SCHILLER, D. L.; GEIGER, B.; KREPLER, R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia tumors and culture cells. **Cell**, **31**:11-24, 1982.
- MONTGOMERY, C. D. **Design and analysis of experiments.** 3ed., New York, 1991, cap 7-9.
- NOWELL, P. C. Mitotic inhibition and chromosome damage by mitomycin in human leucocyte cultures. **Exp Cell Res**, **33**:445-9, 1964.
- 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**:59-63, 1998.
- PENNA, E. P. Mitomycin C after pterygium excision. **Ophthalmology**, **100**:976, Letter, 1993.
- PFISTER, R. R. The healing of corneal epithelial abrasions in the rabbit: a scanning electron microscope study. **Invest Ophthalmol**, **14**(9):648-61, 1975.
- 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.

- POTÉRIO, M. B.; ALVES, M. R.; CARDILLO, J. A.; JOSÉ, N. K. An improved surgical technique for pterygium excision with intraoperative application of mitomycin - C. **Ophthalmic Surg Lasers**, **29**:685-7, 1998.
- POWER, W. J.; NEVES, R. A. Anatomia e fisiologia da córnea. In: BELFORT Jr., R. ; KARA-JOSÉ, N. – **Córnea: clínica-cirúrgica**. São Paulo, Roca, 1997. p.3-15.
- QUINLAN, R. A.; SCHILLER, D. L.; HATZFELD, M.; ACHTSTATTER, T.; MOLL, R.; JORCANO, J. L.; MAGIN, T. M.; FRANKE, W. W. Pattern of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. **Ann NY Acad Sci**, **455**:282-306, 1985.
- RASKA, I; MICHEL, L. C.; JARNIK, M.; DUNDR, M.; FAKAN, S.; GASSER, S.; GASSMANN, M.; HUBSCHER, U.; IZAURRALDE, E.; MARTINEZ, E. Ultrastructural cryoimmunocytochemistry is a convenient tool for the study of DNA replication in cultured cells. **J Electron Microsc Tech**, **18**:91-105, 1991.
- RAVIV, T. MAJMUDAR, P. A.; DENNIS, R. F.; EPSTEIN, R. J. Mytomycin-C for post-PRK corneal haze. **J Cataract Refract Surg**, **26(8)**:1105-6, 2000.
- REN, D. H.; PETROLL, W. M.; JESTER, J. V.; CAVANAGH, H. D. The effect of rigid gas permeable contact lens wear on proliferation of rabbit corneal and conjunctival epithelial cells. **CLAO J**, **25**:136-41, 1999.
- 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.
- RUBINFELD, R. S.; PFISTER, R. R.; STEIN, R. M.; FOSTER, S.; STOLERU, S.; TALLEY, A. R.; SPEAKER, M. G. Serious complications of topical mitomycin C after pterygium surgery. **Ophthalmology**, **99**:1647-54, 1992.
- SAMPAIO, M. W.; KARA-JOSÉ, N.; ALVES, M. R. Efeitos do uso tópico de mitomicina C em olhos de ratas. **Arq Bras Oftal**, **58**:56-9, 1995.
- SANTO, R. M. Disfunções do limbo corneconjuntival. 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 (193nm) 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**(4):580-3, 1985.

SINGH, G.; WILSON, M. R.; FOSTER, C. S. Mitomycin eye drops as treatment for pterygium. **Ophthalmology**, **95**:813-21, 1988.

SINGH, G. Postoperative instillation of low-dose mitomycin C in the treatment of primary pterygium. **Am J Ophthalmol**, **107**:570-1, 1989.

SOONG, H-K.; FAIRLEY, J. A. Actin in human corneal epithelium. **Arch Ophthalmol**, **103**:565-8, 1985.

SUGAR, A. Who should receive mitomycin C after pterygium surgery? **Ophthalmology**, **99**:1645-6, 1992.

SUN, T.-T.; GRENN, H. Immunofluorescent staining of keratin finers in culture cells. **Cell**, **14**:468-76, 1978.

SUN, T.-T.; SHIH, C.; GRENN, H. Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. **Proc Natl Acad Sci Usa**, **76**:2813-17, 1979.

SUN, T.-T.; EICHNER, R.; SCHERMER, A.; COOPER, D.; NELSON W. G.; WEISS, R. A.. Classification, expression and possible mechanisms of evolution of mammalian epithelial keratins: a unifying model. In: LEVINE, A.; TOPP, W.; VANDE WOUDE, G.; WATSON, J. D. **Cancer Cells. – The transformed phenotype**. New York, Cold Spring Harbor, p. 169-76, 1984.

SZERENYI, K.; WANG, X. W.; GABRIELIAN, K.; LaBree, L.; McDONNELL, P. J. Immunochemistry with 5-bromo-2-deoxyuridine for visualization of mitotic cell in the corneal epithelium. **Cornea**, **6**:487-92, 1994.

SZYBALSKI, W.; IYER, V. N. Antibiotics In: GOTTLIEB, D.; SHAW, P. D. - **Antibiotics: mechanisms of action**. New York, Springer, p.211-45, 1967.

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.

THOMAS, C. C. **The rabbit in the eye research**. Springfield – Illinois - USA: Ed. Jack Prince, 1964.

TSAI, R. J.; SUN, T.; TSENG, S. C. G. Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits. **Ophthalmology**, **97**:446-55, 1990.

TSENG, S. C. G. Concept and application of limbal stem cells. **Eye**, **3**:141-57, 1989.

TSENG, S. C. G.; JARVINEN, M. J.; NELSON, W. G.; HUANG, J.; WOODCOCK-MITCHELL, J.; SUN, T. Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies. **Cell**, **30**:361-72, 1982.

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.

USUBA, F. S.; BATTISTELLA, R. Uso de mitomicina C nos casos de neoplasia intraepitelial corneoconjuntival. In: KARA-JOSÉ, N.; ALVES, M.R. **Conjuntiva cirúrgica**. São Paulo, Roca, 1999. 164p.

VANDER, J. F.; KINCAID, M. C.; HEGARTY, T. J.; PAGE, M.; AVERILL, D.; JUNCK, L.; GREENBERG, H. S. The ocular effects of intracarotid bromodeoxyuridine and radiation therapy in the treatment of malignant glioma. **Ophthalmology**, **97**:352-7, 1990.

VAN DIEST, P. J.; BRUGAL, G.; BAAK, J. P. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. **J Clin Pathol**, **51**:716-24, 1998.

WAKAKI, S.; MARUMO, H.; TOMIOKA, K.; SHIMIZU, G.; KATO, E.; KAMADA, H.; KUDO, S.; FUJIMOTO, Y. Isolation of a new fractions of antitumor mitomycins. **Antibiot Chemother**, **8(5)**:228-40, 1958.

WARNAKULASURIYA, K. A.; JOHNSON, N. W. Comparison of isotopic and immunohistochemical methods of studying epithelial cell proliferation in hamster tongue. **Cell Prolif**, **26**:545-55, 1993.

WILSON, G. D.; SAUNDERS, M. I.; DISCHE, S.; DALEY, F. M.; ROBINSON, B. M.; MARTINDALE, C. A.; JOINER, B.; RICHMAN, P. I. Direct comparison of bromodeoxyuridine and Ki-67 labelling indices in human tumours. **Cell Prolif**, **29(3)**:141-52, 1996.

WILSON, M. W.; HUNGERFORD, J. L.; GEORGE, S. M.; MADREPERLA, S. A. Topical mitomycin C for the treatment of conjunctival e 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**: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.

ZAGON, I. S.; SASSANI, J. W.; RUTH, T. B.; McLAUGHLIN, P.J. Cellular dynamics of corneal wound re-epithelialization in the rat. III. Mitotic activity. **Brain research**, **882**:169-79, 2000.



8. ANEXOS

Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research.

Introduction

Research in vision and ophthalmology improves the quality of life. This improvement stems in part from progress in ameliorating human disease and disability, in part from advances in animal health and veterinary medicine, and in part from the enlargement of our understanding of human and animal life. Because so much of vision research is aimed at understanding the structure and function of complex and intricately connected biological systems, work with living animals is vital to continued progress in many areas of clinical and basic research on vision. The proper use of animals in research is an honorable and essential contribution to the improvement of human and animal lives.

Our concern for the humane treatment of animals obliges us always to establish that the potential benefits to human and animal health outweigh the cost in animal lives, and it is desirable for scientific societies such as The Association for Research in Vision and Ophthalmology to formulate guidelines for the humane use of laboratory animals in research.

The remainder of this document provides guidelines which should be acceptable to all reasonable and prudent people. The guidelines are intended principally for the investigator who uses animals in research and who is responsible for their humane treatment. The discussion deals mainly with warm-blooded vertebrates, but the principles can be applied generally. Ethical issues involving the use of any species should be considered in relation to the complexity of its central nervous system and its apparent awareness of its environment.

Guidelines for the Design of Experiments

The fundamental principle is that animals must not be subjected to avoidable distress or discomfort. The investigator's first concern must therefore be to avoid the use of animals when possible.

When it is established that animals must be used, the investigator's obligation is to minimize the animal's distress or discomfort, assessed by anthropomorphic judgments made by reasonable and prudent human observers. Although most research on animals causes little or no distress or discomfort, certain important scientific questions may demand experimental studies that inevitably give rise to discomfort or distress.

In such cases discomfort or distress must be minimized by careful experimental design involving the use of analgesics and/or anesthesia. There is no difference between distress and discomfort that result from the design of a study and distress or discomfort that are its unintended side effects. The investigator must therefore identify and eliminate all avoidable sources of discomfort or distress, taking advantage of veterinary expertise when necessary.

When designing studies that cannot be undertaken without animals, the investigator must justify the use of animals and the species and number needed to provide reliable information. Experiments should be designed to minimize the number of animals used and to avoid depletion of endangered species. Although a few experiments have a risk of unreliable results, advances in experimental methods, within-subjects designs, and modern statistical techniques all help reduce the number of animals used without compromising scientific quality.

Guidelines for the Conduct of Experiments

The quality of the information obtained through research depends in no small measure on the health and general condition of the animals used. Proper animal husbandry is fundamental to the success of any research effort that uses animals.

Research animals must be obtained and cared for in accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals⁴, Institute of Laboratory Animal Resources (<http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guidex.htm>), the OPRR Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals⁶ (revised 1986), and in Canada, the Guidelines of the Canadian Council on Animal Care³. Experienced investigators can contribute very valuable information about the care of animals rarely used in the laboratory and about the use of animals in particular experimental situations.

Investigators in the United States must comply with relevant local, state, and federal laws, including the U.S. Animal Welfare Act, as amended, and its accompanying regulations. An Institutional Animal Care and Use Committee must review and approve the use of animals in vision research in the United States and Canada.

Surgery should be carried out or directly supervised by persons with appropriate levels of experience and training, and surgery performed on animals that will survive (for example, on animals intended for long-term studies) should be undertaken with careful attention to aseptic technique and prevention of infection. Major surgical procedures should be completed under anesthesia that will render the animal insensitive to pain. Muscle relaxants and paralytics have no anesthetic action and must not be used as a substitute for anesthesia. Postoperative care must include efforts to minimize discomfort and the risk of infection.

Some studies require surgical preparation of animals that are not intended to survive. In such cases the animals ordinarily should be maintained unconscious throughout the experiment. At the end of the experiment animals must be euthanatized without recovering consciousness.

Where experiments require physical restraint and/or the withholding of food or water, the effects of which are not themselves the objects of study, care must be taken to minimize discomfort or distress and to ensure that good general health is maintained. Only when there is no alternative procedure should animals be subjected to immobilization or restraint to which they cannot be adapted readily. Whenever it is not inconsistent with good experimental design, the experimental schedule should include reasonable periods of rest and readjustment. In the rare cases where distress and discomfort are unavoidable attributes of a well-designed study, the investigator must, within the limits of the design, take all possible steps to minimize these effects and to minimize the duration of the procedure and the number of animals used.

Factors That Relate Specifically to the Conduct of Vision and Ophthalmology Experiments

Besides the considerations generally applicable to all animal experiments, production of visual disability is a special animal welfare consideration that may apply to some vision research protocols. Visual disability of experimental animals may be either an intrinsic or an unplanned consequence of experimental design. In its definition of major survival surgery, the Guide to the Care and Use of Laboratory Animals⁴ includes any surgical intervention that has the potential for producing a permanent handicap in an animal that is expected to recover. Hence, any experimental procedure that results in, or has the potential to result in, a level of visual disability sufficient to disrupt an animal's normal daily activity should be considered a major survival procedure. Such procedures require appropriate justifications and suitable animal care accommodations.

Protocols involving bilateral survival ocular procedures require special consideration and justification, with particular attention to any visual consequences. Such procedures include bilateral ocular surgeries, whether performed simultaneously or sequentially, and any other experiments with the potential to affect vision bilaterally. The Guide to the Care and Use of Laboratory Animals⁴ recommends that animals not be subjected to multiple major survival surgical procedures unless they are related components of a particular research project. Accordingly, a visually disabling procedure should not be performed bilaterally unless the two procedures are related components of a specific project. As noted in the Guide⁴, cost savings alone is not an adequate justification for performing multiple survival surgical procedures.

Vision investigators are encouraged to distribute unrelated tissues to investigators in other research areas and, where practical, to obtain suitable ocular tissues from investigators working on other organs. This recommendation applies to all species.

Inherited disorders of the visual system are significant health problems for both humans and animals. Even so, the breeding of animals with genetic disorders leading to blindness needs specific justification. Investigators who breed genetically impaired animals are encouraged to share such animals and tissues with qualified investigators having complementary expertise, including those outside their own institution.

Investigators Outside the United States

Although the laws that regulate the care and use of animals in the United States are not directly applicable to citizens of foreign countries, ARVO endorses the policies in the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals⁴, the OPRR Public Health Service Policy on the Humane Care and Use of Laboratory Animals⁶ (revised 1986), and the U.S. Animal Welfare Act, as amended. If ARVO is to support a vision scientist under scrutiny by animal activists, the vision science experiment involving animals must conform to the guidelines established in these documents, even though they are not necessarily enforceable by law in the country in which the experiment is performed.

Recommended References

In addition to these Guidelines, the following references on the care and use of animals in vision research are recommended.

- 1) *The Biomedical Investigator's Handbook for Researchers Using Animal Models*. Foundation for Biomedical Research, 818 Connecticut Avenue, NW, Suite 303, Washington, DC 20006.
- 2) *FASS Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*. Federation of Animal Sciences Societies, 1111 North Dunlap Avenue, Savoy, IL 61874.
- 3) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Research Council.
- 4) *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Canadian Council on Animal Care, 151 Slater, Ottawa, Ontario, Canada K1P 5H3.
- 5) *Guide to the Care and Use of Laboratory Animals*. Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy Press, 2101 Constitution Avenue, NW, Washington, DC 20418.
- 6) *Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook*. Applied Research Ethics National Association, 132 Boylston Street, Boston, MA 02116.
- 7) *OPRR Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals* (revised 1986). Office for Protection from Research Risks, Bldg. 31, Rm. 4B09, 9000 Rockville Pike, Bethesda, MD 20892.
- 8) *Public Health Service (PHS) Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals*. National Institutes of Health, Office of the Director, revised 1986, reprinted 1996.

9) *The Recommendations for Governance and Management of Institutional Animal Resources*. Association of American Medical Colleges, Association of American Universities, 1 Dupont Circle, NW, Suite 200, Washington, DC 20036.

10) *USDA - Animal Welfare Regulations*

Updated 10/25/

RESOLUÇÃO Nº 592, DE 26 DE JUNHO DE 1992

- Enquadra as Entidades obrigadas a registro na Autarquia: CFMV-CRMVs, dá outras providências, e revoga as Resoluções nºs 80/72; 182/76; 248/79 e 580/91.

Princípios éticos na experimentação animal

A evolução contínua das áreas de conhecimento humano, com especial ênfase àquelas de biologia, medicina humana e veterinária, e a obtenção de recursos de origem animal para atender necessidades humanas básicas, como nutrição, trabalho e vestuário, repercutem no desenvolvimento de ações de experimentação animal, razão pela qual se preconizam posturas éticas concernentes aos diferentes momentos de desenvolvimento de estudos com animais de experimentação.

Postula-se:

Artigo I - É primordial manter posturas de respeito ao animal, como ser vivo e pela contribuição científica que ele proporciona.

Artigo II - Ter consciência de que a sensibilidade do animal é similar à humana no que se refere a dor, memória, angústia, instinto de sobrevivência, apenas lhe sendo impostas limitações para se salvaguardar das manobras experimentais e da dor que possam causar.

Artigo III - É de responsabilidade moral do experimentador a escolha de métodos e ações de experimentação animal

Artigo IV - É relevante considerar a importância dos estudos realizados através de experimentação animal quanto a sua contribuição para a saúde humana em animal, o desenvolvimento do conhecimento e o bem da sociedade.

Artigo V - Utilizar apenas animais em bom estado de saúde.

Artigo VI - Considerar a possibilidade de desenvolvimento de métodos alternativos, como modelos matemáticos, simulações computadorizadas, sistemas biológicos "in vitro", utilizando-se o menor número possível de espécimes animais, se caracterizada como única alternativa plausível.

Artigo VII - Utilizar animais através de métodos que previnam desconforto, angústia e dor, considerando que determinariam os mesmos quadros em seres humanos, salvo se demonstrados, cientificamente, resultados contrários.

Artigo VIII - Desenvolver procedimentos com animais, assegurando-lhes sedação, analgesia ou anestesia quando se configurar o desencadeamento de dor ou angústia, rejeitando, sob qualquer argumento ou justificativa, o uso de agentes químicos e/ou físicos paralizantes e não anestésicos.

Artigo IX - Se os procedimentos experimentais determinarem dor ou angústia nos animais, após o uso da pesquisa desenvolvida, aplicar método indolor para sacrifício imediato.

Artigo X - Dispor de alojamentos que propiciem condições adequadas de saúde e conforto, conforme as necessidades das espécies animais mantidas para experimentação ou docência.

Artigo XI - Oferecer assistência de profissional qualificado para orientar e desenvolver atividades de transportes, acomodação, alimentação e atendimento de animais destinados a fins biomédicos.

Artigo XII - Desenvolver trabalhos de capacitação específica de pesquisadores e funcionários envolvidos nos procedimentos com animais de experimentação, salientando aspectos de trato e uso humanitário com animais de laboratório.

Resultados das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região (nasal, central e temporal) nos animais do lote A (sacrificados em 4 dias) que receberam SF (solução fisiológica 0,9%).

Técnica	Soro fisiológico		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial prévia ao SF	1/1/1	4/2/0	6/10/2
	6/4/7	2/6/0	2/2/1
	0/0/0	25/10/2	34/30/35
	4/0/3	11/13/5	11/20/20
	0/0/0	2/0/1	15/16/22
Desepitelização parcial após SF	2/1/3	4/4/4	8/10/6
	2/1/1	6/8/6	9/4/4
	8/4/4	13/16/12	29/32/16
	3/6/0	10/7/7	10/12/8
	5/5/1	0/9/6	29/13/17

Resultados das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região (nasal, central e temporal) nos animais do lote A (sacrificados em 4 dias) que receberam mitomicina C.

Técnica	Mitomicina C		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial prévia à MMC	0/0/0	0/0/0	9/5/5
	0/0/0	0/0/0	10/7/8
	2/2/7	4/4/0	3/2/0
	4/6/4	22/10/13	15/14/15
	1/1/2	3/0/1	1/3/2
Desepitelização parcial após MMC	1/2/0	9/1/4	16/25/20
	0/0/7	23/27/9	18/10/1
	4/3/3	4/3/5	3/6/2
	6/4/1	10/5/5	16/6/4
	6/6/6	4/1/4	2/0/2

Resultados das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região (nasal, central e temporal) nos animais do lote B (sacrificados em 15 dias) que receberam SF (solução fisiológica 0,9%).

Técnica	Soro fisiológico		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial prévia ao SF	4/4/3	5/3/2	0/0/0
	31/23/11	19/15/16	50/18/7
	4/1/0	0/4/1	3/5/6
	22/7/6	9/26/2	5/22/18
Desepitelização parcial após SF	13/9/3	7/5/11	17/11/9
	2/1/2	2/4/4	1/4/4
	5/3/6	5/7/3	3/4/2
	2/0/0	3/4/2	7/4/2

Resultados das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região (nasal, central e temporal) nos animais do lote B (sacrificados em 15 dias) que receberam mitomicina C.

Técnica	Mitomicina C		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial prévia à MMC	5/1/3	9/7/7	1/1/4
	3/2/4	3/3/0	3/2/1
	1/2/2	10/3/5	4/10/6
	2/6/0	0/3/2	2/3/0
Desepitelização parcial após MMC	2/3/5	15/4/2	3/1/3
	2/8/5	2/10/6	1/4/2
	0/0/1	1/1/0	3/1/1
	1/2/3	6/0/0	0/0/2

Resultados das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região (nasal, central e temporal) nos animais do lote C (sacrificados em 45 dias) que receberam SF (solução fisiológica 0,9%).

Técnica	Soro fisiológico		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial prévia ao SF	3/2/16	13/36/16	14/8/13
	6/0/1	7/12/11	11/0/0
	2/0/4	24/8/14	41/16/8
Desepitelização parcial após SF	4/2/2	8/6/11	7/3/1
	1/5/4	12/18/12	9/6/16
	1/8/10	16/11/11	5/11/0

Resultados das contagens de células coradas com BrdU, obtidas nos 3 campos de cada região (nasal, central e temporal) nos animais do lote C (sacrificados em 45 dias) que receberam mitomicina C.

Técnica	Mitomicina C		
	nasal	central	temporal
Desepitelização parcial prévia à MMC	6/0/2	11/11/3	2/0/0
	3/6/11	5/4/8	2/4/7
	0/0/5	13/5/0	4/10/41
	15/1/4	8/3/3	0/0/0
Desepitelização parcial após MMC	0/3/0	9/2/0	3/3/0
	0/0/1	4/1/0	4/3/0
	29/30/0	1/7/6	4/9/11
	21/12/9	0/0/0	9/0/0

FIGURAS

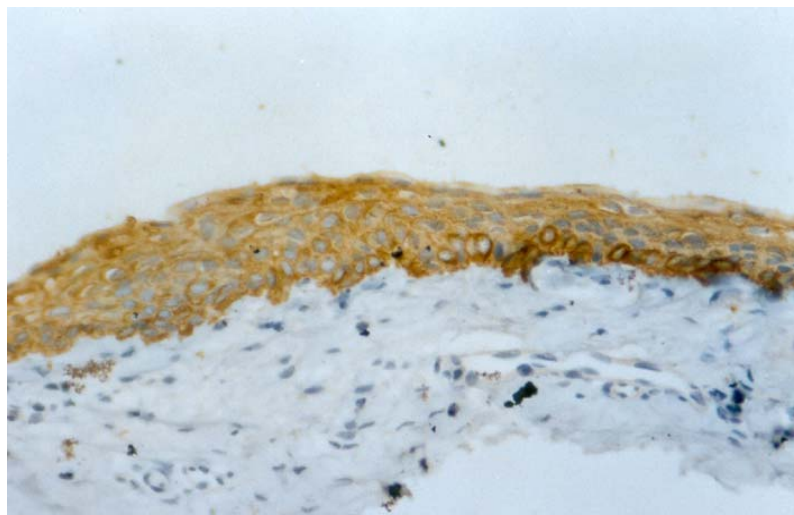


Figura 5– Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote A. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (AE1/ AE3, 400X)

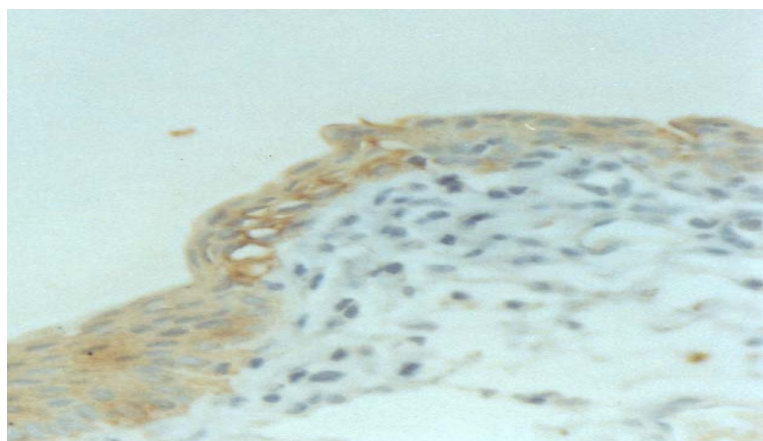


Figura 6– Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote B. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (AE1/ AE3, 400X)

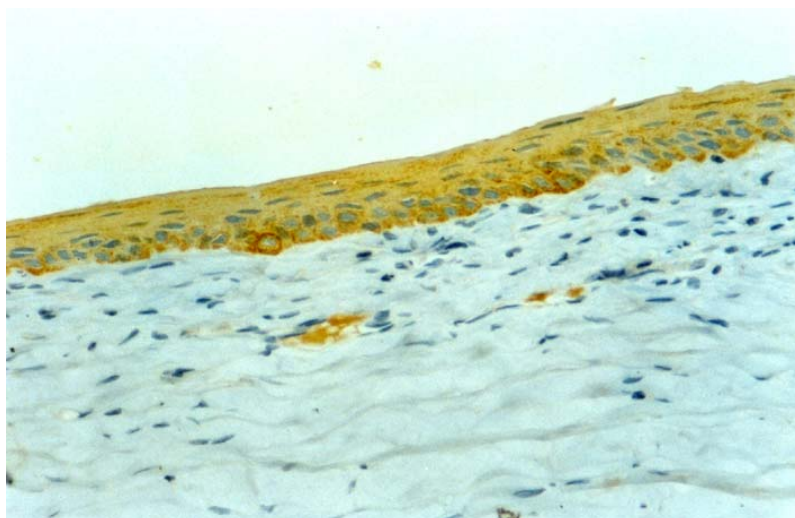


Figura 7– Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote C. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (AE1/ AE3, 400X)

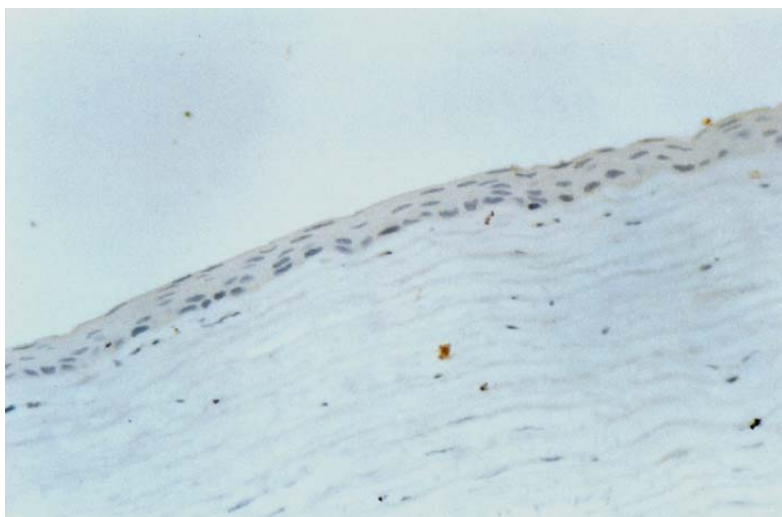


Figura 8– Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea controle negativo para os anticorpos primários AE1/ AE3. Nota-se ausência de células marcadas. (400X)

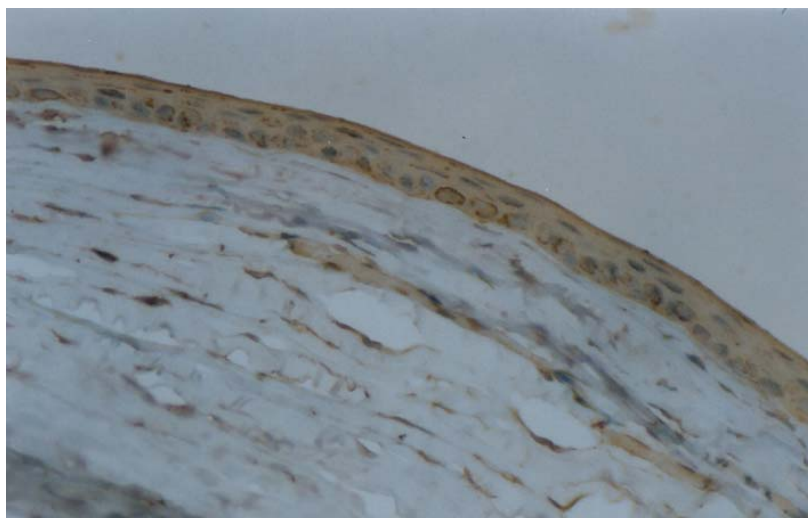


Figura 9– Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote A. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (AE5, 400X)

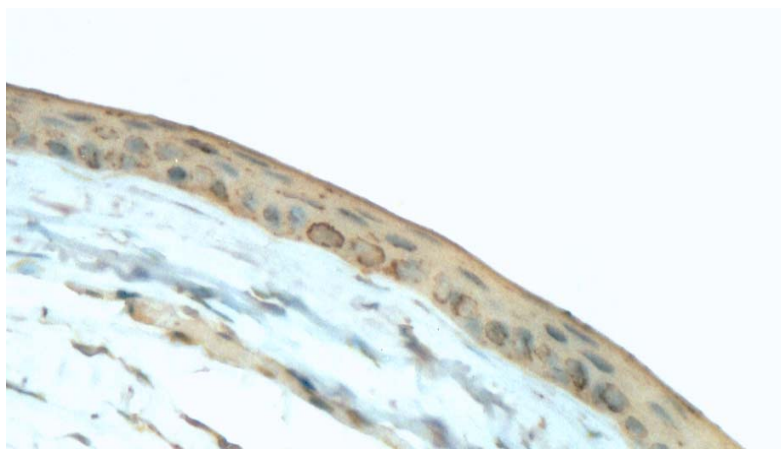


Figura 10– Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote B. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (AE5, 400X)

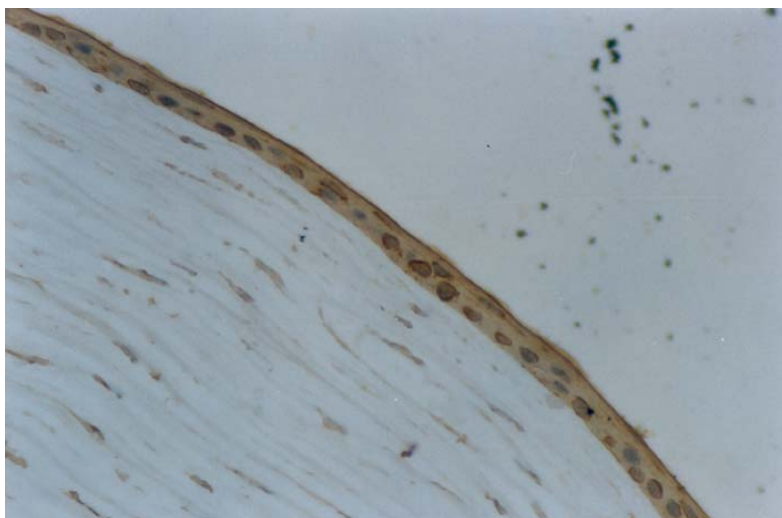


Figura 11– Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote C. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (AE5, 400X)

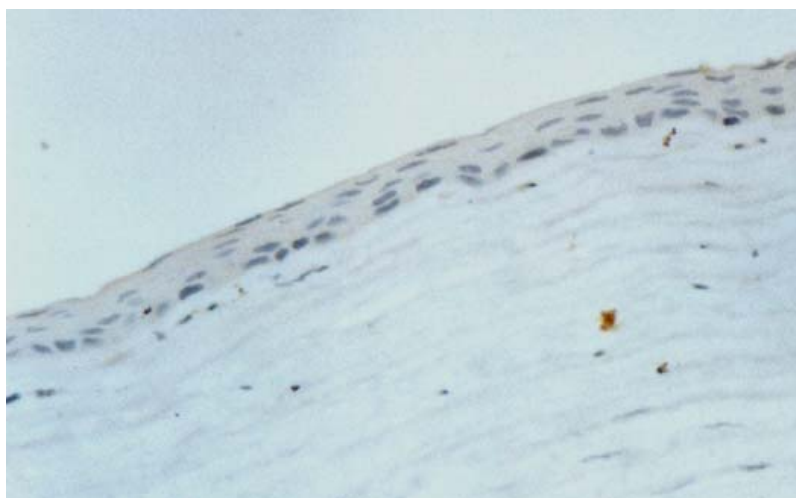


Figura 12– Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea controle negativo para os anticorpos primários AE5. Nota-se ausência de células marcadas. (400X)

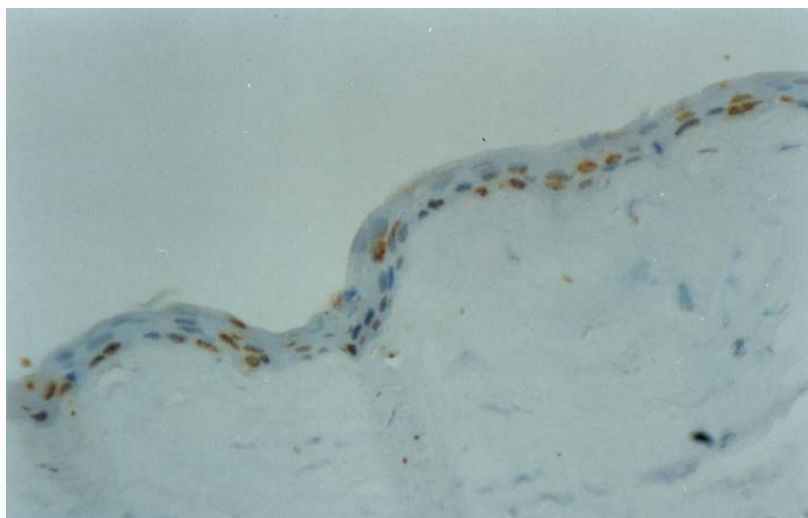


Figura 13– Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote A. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (BrdU, 400X)

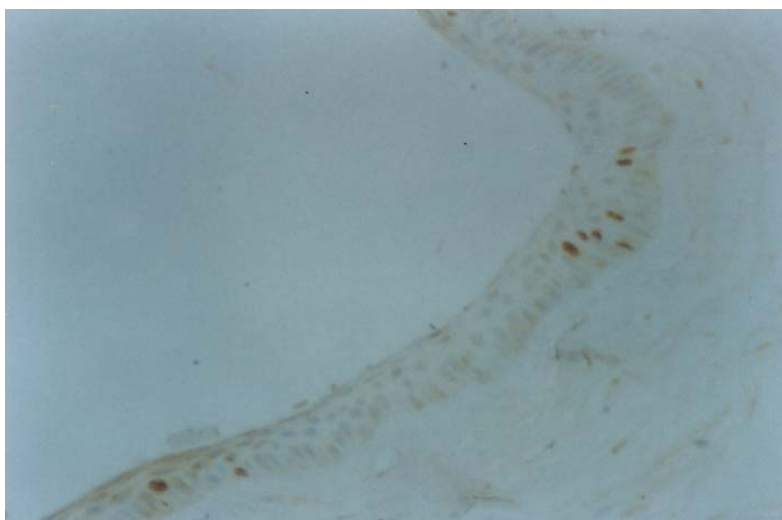


Figura 14– Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote B. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (BrdU, 400X)

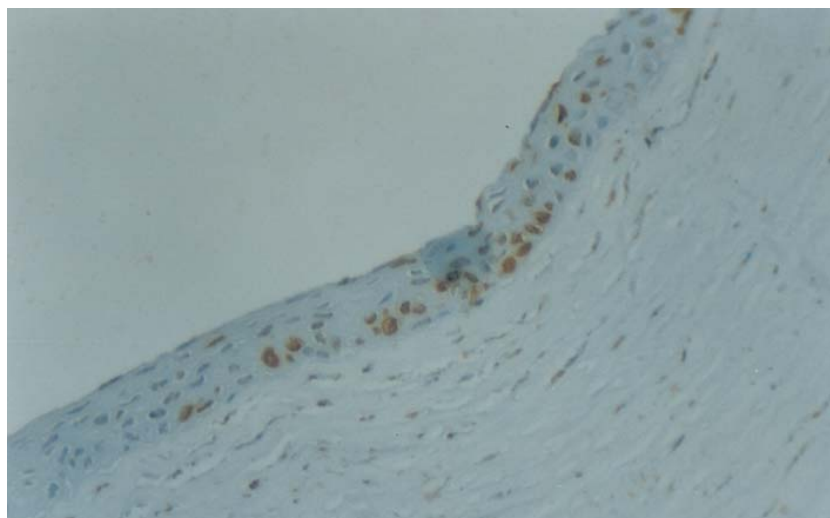


Figura 15– Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea do lote C. Exemplo da disposição das células marcadas nas camadas basal e suprabasal do epitélio. (BrdU, 400X)

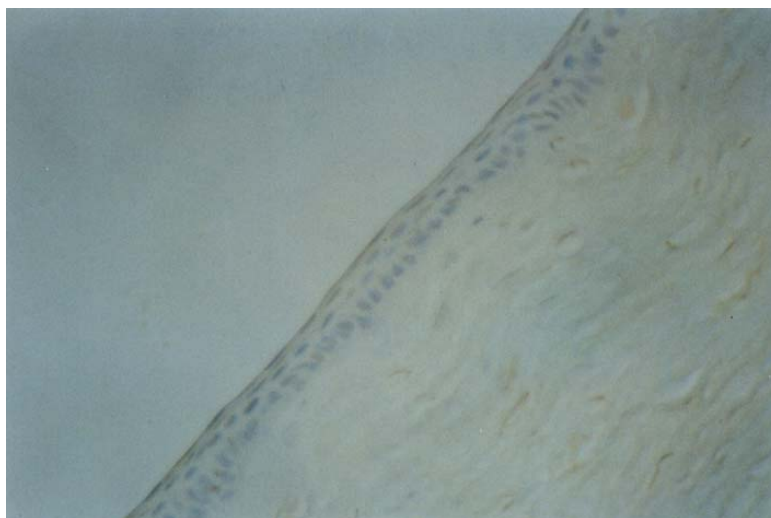


Figura 16– Microscopia óptica de espécime contendo epitélio da córnea controle negativo para os anticorpos primários BrdU. Nota-se ausência de células marcadas. (400X)