

Efeitos de algumas drogas sobre a proliferação de fibroblastos de pterígio primário in vitro

Effects of some drugs in the fibroblastic proliferation in primary pterygium in vitro

Juliana Almodin¹, Flavia Almodin², Edna Almodin³, Vânia Cibele Minguetti-Câmara⁴, João Paulo Neves⁵, Ana Karina Teixeira Bezzon⁶, Carla Emília Diniz Maciel Safar⁷, Helaine Belato Bertanha Amadeu⁸

RESUMO

Objetivo: Este estudo tem por objetivo observar a inibição da proliferação celular in vitro em pterígios primários utilizando mitomicina C, ciclofosfamida e metotrexato. **Métodos:** Os pterígios foram retirados de 7 pacientes com idade entre 30 e 60 anos e foram submetidos à cultura de suas células epiteliais. Foi então verificado o efeito de drogas sobre as células: ciclofosfamida, metotrexato e mitomicina. As células foram observadas por 5 dias ao microscópio para avaliar a proliferação celular e os experimentos foram repetidos 5 vezes. **Resultados:** Quando a mitomicina foi utilizada observou-se importante inibição da proliferação celular. Quando a ciclofosfamida foi utilizada houve também inibição do crescimento, 50% após 24 horas de cultura após a exposição da droga aumentando nos dias subsequentes. Nenhum efeito foi observado quando o metotrexato foi utilizado. **Conclusão:** Os efeitos de inibição da proliferação celular pela mitomicina C já eram esperados, porém a ciclofosfamida também apresentou-se bastante eficaz. A ação inibitória da ciclofosfamida sobre a proliferação fibroblástica in vitro nos leva a acreditar que ela possa ser usada para prevenir a recorrência do pterígio depois da excisão. Entretanto, testes em animais e posteriormente em humanos se fazem necessários para se chegar a essa conclusão.

Descritores: Proliferação celular/efeito de drogas; Mitomicina/uso terapêutico; Ciclofosfamida; Pterígio/quimioterapia; Metotrexato/uso terapêutico; Recidiva/prevenção & controle

ABSTRACT

Objective: This study aims at observing the inhibition of cell proliferation in primary pterygium by the use in vitro of mitomycin C, cyclophosphamide, methotrexate. **Methods:** Pterygium was removed from seven patients between 30 and 60 years and were submitted to culture of epithelial cells. Later the effect of drugs was tested on the cells: cyclophosphamide, methotrexate, mitomycin. The cells were observed for five days under the microscope to assess cellular proliferation, and the experiments were repeated five times. **Results:** When mitomycin was used, a marked inhibition of cellular proliferation was observed. When cyclophosphamide was used there also was inhibition of cellular proliferation, 50% within 24 hs of the culture exposition to the drug increasing in the following days. **Conclusion:** The inhibition effects in the cellular proliferation by the use of mitomycin C was already expected, but the use of cyclophosphamide was also very effective. The cyclophosphamide inhibitory action on fibroblastic proliferation in vitro lead us to believe that it may be used to prevent pterygium recurrence after incision. However, tests in animals and later in humans are necessary.

Keywords: Cell proliferation/drug effects; Mitomycin/therapeutic use; Cyclophosphamide; Pterygium/drug therapy; Methotrexate/therapeutic use; Recurrence/prevention & control

¹ Departamento de Glaucoma da Pró Visão Hospital de Olhos de Maringá – Maringá (PR), Brasil;

² Centro de Oftalmologia Tadeu Cvintal – São Paulo (SP), Brasil;

³ Pró Visão Hospital de Olhos de Maringá – Maringá (PR), Brasil;

⁴ Departamento de Bioquímica do Hospital Universitário de Maringá – Maringá (PR), Brasil;

⁵ Departamento de Retina e Vítreo do Hospital de Base de São José do Rio Preto – São José do Rio Preto (SP), Brasil;

⁶ Clínica Visclín Oftalmologia - São Paulo (SP), Brasil;

⁷ Oncoclínica – Maringá (PR), Brasil;

⁸ Programa de Pós-graduação (Mestrando) da Universidade Estadual de Maringá – UEM – Maringá (PR), Brasil.
Hospital de Olhos Redentora – São José do Rio Preto (SP), Brasil

O autor declara não haver conflitos de interesse

Recebido para publicação em: 20/10/2011 - Aceito para publicação em: 14/10/2012

INTRODUÇÃO

O pterígio do grego *pterygos*, “braço” é caracterizado por ser um tecido fibrovascular, degenerativo, elástico, basofílico e subepitelial de aspecto triangular, que cresce a partir da conjuntiva bulbar em direção a córnea. Pode ser primário ou recorrente, sendo este definido como a proliferação de tecido fibrovascular de aspecto semelhante ao pterígio primário retirado e secundário a uma reação inflamatória. A recidiva vem acompanhada de inflamação conjuntival e envolvimento corneano pronunciado. Múltiplas intervenções cirúrgicas na região límbica determinam disfunções locais severas e o crescimento de tecido fibroso que pode levar a formação do simbléfaro.

O pterígio é uma anormalidade que afeta grande número de pessoas em todo o mundo, principalmente em áreas geográficas mais próximas ao equador, tropicais e subtropicais onde o clima é mais quente e onde os raios ultra-violetas são mais intensos. Este fato, bem como a observação de maior prevalência em indivíduos que trabalham ao ar livre, acaba por estabelecer uma forte relação com a exposição a radiações actínicas, mais específicos raios UV do tipo UV-A e UV-B⁽¹⁾. De fato, a radiação UV é considerada fator indutor de dano às células germinativas límbicas, aumentando o risco de desenvolvimento de pterígio e tornando-o uma das causas mais frequentes de procura ao oftalmologista. É uma afecção de etiologia multifatorial, relacionada também a inflamações crônicas, microtraumatismos de repetição, hereditariedade, idade, exposição ao vento, areia, poeira e distúrbios imunológicos⁽²⁾.

Apresenta evolução lenta e progressiva, frequentemente associada a sintomas irritativos (ardor, sensação de corpo estranho, hiperemia) e diminuição da AV a qual pode ocorrer pela invasão do eixo visual (área pupilar) e por alterações do filme lacrimal e astigmatismo irregular induzido (podendo chegar a 3 dioptrias)⁽¹⁾.

Até o presente momento, a única conduta disponível para sua resolução completa é a remoção cirúrgica que está indicada em casos em que há prejuízo da AV, inflamações crônicas, alterações cosméticas, restrição da motilidade ocular e sintomas irritativos persistentes⁽²⁾. O alto índice de recidiva demonstrado após a excisão do pterígio levou ao desenvolvimento de diversas técnicas cirúrgicas e utilização de terapias adjuvantes⁽³⁾. Entre as técnicas empregadas para sua remoção cita-se retalho conjuntival, transplante autólogo de conjuntiva⁽⁴⁾, enxerto de mucosa oral⁽⁵⁾, ceratoplastia lamelar, ceratoplastia penetrante⁽⁴⁾, escleroceratoplastia e membrana amniótica⁽⁴⁾. A excisão com raspagem de esclera, técnica descrita por D’Obrim (1948) é o procedimento mais comum para o tratamento do pterígio. Entretanto, esta técnica é acompanhada por uma taxa de recorrência de 5% a 89%. Diferentes tratamentos adjuvantes à ressecção do pterígio têm possibilitado diminuir a taxa de recorrência, mas complicações variadas têm sido relatadas por causa dos seus usos⁽³⁾. Nosso trabalho tem o objetivo de pesquisar novas drogas que possam auxiliar na diminuição da recorrência do pterígio. Para isso verificamos a inibição do crescimento de fibroblastos de pterígio in vitro na presença de algumas drogas.

Métodos

Pacientes

Os pterígios foram retirados de 7 pacientes (3 homens e 4 mulheres), com idade entre 30 e 60 anos, após consentimento informado. Todos os pterígios eram primários sem nenhuma doença ocular associada.

Métodos

Cultura de células epiteliais do pterígio

O protocolo para o cultivo celular foi estabelecido de acordo com modificações da técnica Kria et al.⁽⁶⁾, onde imediatamente após a retirada do pterígio, este era lavado em solução balanceada de Earle’s (Materbaby, Maringá, PR, Brasil) contendo penicilina (200 micra/ml), estreptomocina (100 micra/ml) (SIGMA, St Louis, MO, USA), anfotericina B (100 micra/ml) e fungizona (5 micra/ml) (GIBCO, Grand Island, NY, USA). Os pterígios foram cortados em pedaços de aproximadamente 2x2 ou 2x3 mm e colocados em placas plásticas de 60mm contendo meio MEM “Minimal essential media” (Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte (MG), Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) e antibióticos na mesma concentração descrita acima. As placas foram então incubadas a 37° em incubadora umidificada contendo 5% de CO₂. O meio era trocado duas vezes por semana, sendo retirado 70% do meio e recolocado 70% de meio fresco.

Testando o efeito das drogas sobre as células

Quando houve a formação da primeira camada de células, estas foram destacadas depois da incubação em solução de tripsina – EDTA 0,25% sem Ca⁺⁺ e MG⁺⁺ (GIBCO, Grand Island, NY, USA) à temperatura ambiente por 1 minuto. Depois da tripsinização, a tripsina foi inativada por adição de MEM com 10% de soro fetal bovino e as células foram lavadas no mesmo meio, centrifugadas e ressuspensas para uma contagem primária. As células foram então adicionadas às placas de 4 buracos a uma densidade de 2x10⁴ células/ml, para serem subcultivadas. Após 2 dias de crescimento as drogas foram adicionadas às células nas seguintes concentrações: 1000 micra/ml ou 20 mg/ml: ciclofosfamida (Baxter Oncology GmbH, Frankfurt, Alemanha), 500 micra/ml ou 10 mg/ml; metotrexato (Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas (SP), Brasil), 1000 micra/ml ou 20 mg/ml e mitomicina (Bristol-Myers Squibb Brasil S.A., Santo Amaro, SP, Brazil), 20 micra/m² ou 0,4 mg/ml. As drogas foram diluídas em meio MEM com 10% de soro colocado na estufa 12 horas antes da utilização para estabilização do PH. Imediatamente após a diluição as drogas eram adicionadas às células e as placas retornavam para a estufa. As células foram observadas diariamente por 5 dias ao microscópio de contraste de fase para avaliar a proliferação celular. Foi realizado controle negativo quando nenhuma droga era adicionada. Os experimentos foram repetidos 5 vezes.

RESULTADOS

Com a utilização da mitomicina observou-se uma significativa inibição da proliferação celular. Já nas primeiras 24 horas observou-se que as células desprendiam-se da placa em quase a totalidade da extensão. Quando a ciclofosfamida era utilizada observou-se também inibição do crescimento. As células encontravam-se não aderidas à placa de cultivo em aproximadamente 50% de sua extensão após 24 horas de cultura após exposição à droga, aumentando nos dias subsequentes, atingindo quase a totalidade da extensão após 72 horas. Nenhum efeito foi observado, no entanto as células não apresentaram degeneração aparente, mesmo após 120 horas de cultivo em presença da droga. Nenhum efeito foi observado quando o metotrexato foi utilizado, mesmo após 120 horas de cultivo, as células mantiveram-se aderidas às placas e um crescimento aparente foi observado. O mesmo foi observado na placa de controle, cresci-



Figura 1: Ciclofosfamida 24h



Figura 2: Metotrexato 24h

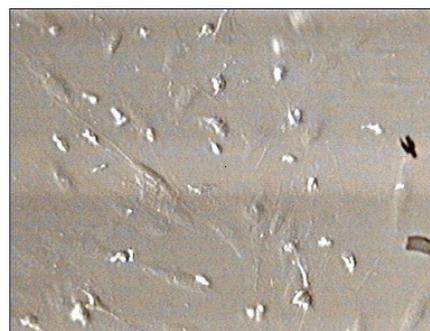


Figura 3 - Mitomicina 24hs



Figura 4: Controle 24h



Figura 5: Ciclofosfamida 72h



Figura 6 - Metotrexato 120hs

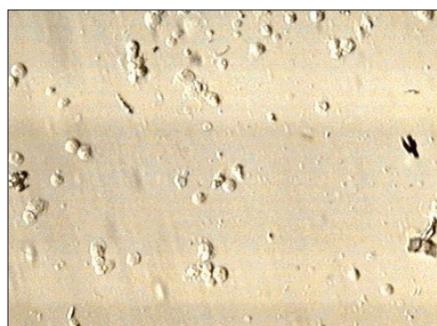


Figura 7: Ciclofosfamida 72h



Figura 8: Mitomicina 72h



Figura 9: Controle 72h

mento celular com as células aderidas às placas. O PH das placas foi medido após 24 horas e observou-se que nas placas onde a mitomicina, o metotrexato e a ciclofosfamida eram adicionadas o PH encontrava-se em torno de 7,0 (Ver figuras 1 - 9).

DISCUSSÃO

Como terapia adjuvante da excisão do pterígio a mitomicina C tem sido bastante utilizada para prevenir a recorrência deste, seja através do uso intraoperatório ou pós-operatório. Singh et al. após ressecção do pterígio pela técnica de esclera exposta e uso de colírio de mitomicina C relataram taxa de recorrência de 2,2% comparada com 88,9% dos controles tratados com placebo⁽⁷⁾. A partir daí o uso desse antimetabólico popularizou-se, sendo atualmente indicado para reduzir recorrências pós-operatórias do pterígio. Entretanto sérias complicações visuais depois de seu uso preocupam muitos cirurgiões. Efeitos como irritação conjuntival e complicações como ceratite, necrose da esclera com ou sem inflamação (escleromalácia), glaucoma secundário, catarata, edema e perfuração de córnea e calcificação da esclera têm sido relatados⁽⁸⁾. A mitomicina C é

um agente “radiomimético” que pode causar uma necrose avascular similar àquela da radiação beta.

Em 1992, Rubinfeld et al. relataram 10 casos de complicações graves relacionadas ao uso de mitomicina C tópica após cirurgia de pterígio e raspagem da esclera. Essa técnica predispõe o olho a efeitos vasculares da mitomicina, que podem levar à corrosão de esclera, mas ainda assim é a técnica mais utilizada por ser a mais fácil de ser realizada⁽⁹⁾.

A busca por maior segurança no uso da mitomicina C levou ao uso de concentrações cada vez menores desta droga, que continuaram sendo eficazes na redução das recorrências. Entretanto, recentemente foi relatado um caso onde uma baixa dose (0,02%) usada por apenas 3 minutos levou à perfuração córneo-escleral⁽¹⁰⁾.

A mitomicina tem sido bastante utilizada, mas há que se tomar certos cuidados em sua utilização. A droga não deve entrar em contato com áreas desepitelizadas e nem deixar a esclera exposta após sua aplicação. A mitomicina colocada em contato com área de defeito epitelial corneano, como aquele produzido quando da remoção do pterígio, provoca retardo na sua reparação⁽¹¹⁾. Deve-se evitar excessiva cauterização da esclera e não deixar a área escleral de ressecção do pterígio exposta no final

do procedimento cirúrgico. Dano escleral devido à delaminação e à cauterização excessivas e ainda o efeito vasoclusão da mitomicina C e a instabilidade do filme lacrimal nessa área podem predispor ao afinamento e necrose escleral dessas áreas⁽¹¹⁻¹³⁾. Além disso, deve-se evitar o uso de mitomicina C em pessoas idosas e em portadores de pterígio atrófico, quando as possibilidades de recorrência são pequenas. Não deve ser empregada em olhos secos ou com alterações da superfície ocular⁽⁹⁾.

O uso da radiação beta também tem levado a uma diminuição da taxa de recorrência para 5 a 33%, mas também está associada a sérias complicações⁽¹⁴⁾. Devido a essa insatisfação com o uso da mitomicina e outras terapias adjuvantes, resolvemos pesquisar outras drogas que pudessem auxiliar na diminuição da recorrência do pterígio. Como a recorrência desse não parece estar associada com exposição à luz ultravioleta e sim devido a uma acelerada proliferação fibroblástica, produzida pelo trauma da operação⁽¹⁵⁾, resolvemos realizar experimentos in vitro para verificar a inibição do crescimento dos fibroblastos de pterígio frente a algumas drogas escolhidas. Essas drogas são utilizadas em tratamento de neoplasias. Foram escolhidas por não serem vesicantes⁽¹⁶⁾, pois acreditamos que os efeitos indesejados da mitomicina sobre o olho sejam principalmente devido à droga ter esse efeito. As drogas vesicantes são aquelas que provocam irritação severa com formação de vesículas e destruição tecidual quando infiltradas fora do vaso sanguíneo e podem ocasionar necrose.

Os resultados da mitomicina C em inibir a proliferação dos fibroblastos de pterígio em nossos experimentos, já eram esperados, porém a ciclofosfamida também apresentou-se bastante eficaz. A ciclofosfamida pertence ao grupo das cloroetilaminas, é um agente alquilante bifuncional, não possuindo especificidade por fase alguma do ciclo celular⁽¹⁷⁾. Já a mitomicina é um antimetabólito alquilante, atua ligando-se ao DNA, acarretando ligações anômalas e quebras em sua estrutura, inibindo a mitose, a síntese proteica e levando a morte celular⁽¹⁸⁾. A ação inibitória da ciclofosfamida sobre a proliferação fibroblástica in vitro nos leva a acreditar que ela possa ser usada para prevenir a recorrência do pterígio após a sua retirada. Em 1983, pela primeira vez foi descrito o uso da mitomicina C, um agente potente na inibição fibroblástica em cirurgias filtrantes, desde então vários autores comprovaram os excelentes resultados do uso intraoperatório, especialmente nos glaucomas refratários⁽¹⁹⁾. O que nos leva também a pensar no uso da ciclofosfamida para a mesma ação da mitomicina nas cirurgias filtrantes. A ciclofosfamida é um éster fosfamidico cíclico da mecloretamina, que causa o impedimento da divisão celular primariamente por ligação cruzada de cordões de DNA. Ela foi utilizada numa dosagem maior que a mitomicina C, pois as concentrações usadas nesse trabalho foram as mesmas indicadas em casos de neoplasias, sendo que nesses casos a quantidade de mitomicina é sempre bem menor que a de ciclofosfamida.

O efeito sobre a proliferação celular observado com a ciclofosfamida, não foi observado com o metotrexato, levando-nos a afirmar que nem toda droga antimitótica tenha efeito sobre o crescimento do pterígio. Resta-nos saber se a ciclofosfamida apresentará algum efeito adverso que contra indique sua utilização para evitar a recorrência do pterígio ou até mesmo para as cirurgias filtrantes. Testes em animais e posteriormente em humanos se fazem necessários para se chegar a essa conclusão.

REFERÊNCIAS

- Rossi EE, Broetto D, Grumann Júnior A. Análise dos pterígio operados no Hospital Regional de São José. *Rev Bras Oftalmol*. 2003;62(1):44-9.
- Ferraz FHS, Schellini SA, Hoyama E, Bernardes SR, Padovani CR. Pterígio e alterações da curvatura corneana. *Arq Bras Oftalmol*. 2002;65(5):533-6.
- Alves RA, Potério MB, Potério CB, Cardillo JA, José NK. Pterígio: terapêutica adjuvante. www.hospvirt.org.br
- Samahá JT, Schellini SA, Sakamoto RH, Padovani CR. Tratamento do pterígio recidivado por transplante autólogo da conjuntiva. *Arq Bras Oftalmol*. 2002;65(4):415-8.
- Fairbanks D, Vieira LA, Santos WD, Attie GCG, Gomes JAP, Freitas D. Membrana amniótica no tratamento dos afinamentos corneais e esclerais. *Arq Bras Oftalmol*. 2003;66(1):71-6.
- Kria L, Ohira A, Amemiya T. TNP-470 (a fungus-derived inhibitor of angiogenesis) reduces proliferation of cultured fibroblasts isolated from primary pterygia: a possible drug therapy for pterygia. *Curr Eye Res*. 1998;17(10):986-93.
- Singh G, Wilson MR, Foster CS. Mitomycin eye drops as treatment for pterygium. *Ophthalmology*. 1998;95(6):813-21.
- Chen S, Noonan C. Scleral laceration complicating primary pterygium excision. *Eye (Lond)*. 2000;14(Pt 1):100-1.
- Rubinfeld RS, Pfister RR, Stein RM, Foster CS, Martin NF, Stoleru S, et al. Serious complications of topical mitomycin-C after pterygium surgery. *Ophthalmology*. 1992;99(11):1647-54. Comment in *Ophthalmology*. 1993;100(7):976; author reply 977-8. *Ophthalmology*. 1992;99(11):1645-6. *Ophthalmology*. 1993;100(3):292-3. *Ophthalmology*. 1993;100(7):976-7; author reply 977-8.
- Dadeya S, Fatima S. Comeoscleral perforation after pterygium excision and intraoperative mitomycin C. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2003;34(2):146-8.
- Alves MR, Potério MB, Cardillo JA. Nova técnica cirúrgica para ressecção de pterígio em associação com o uso intra-operatório de mitomicina C. *Rev Bras Oftalmol*. 1997;56(6):441-3.
- Alves MR, Saldiva PHN, Lemos M, José NK. Efeitos do uso tópico da mitomicina C no epitélio corneano de coelhas: análise histopatológica pela morfometria. *Arq Bras Oftalmol*. 1996;59(5):431-7.
- Potério MB, Alves MR, Cardillo JA, José NK. An improved surgical technique for pterygium excision with intraoperative application of mitomycin C. *Ophthalmic Surg Lasers*. 1998;29(8):685-7.
- Haik GM, Ellis GS, Nowell JF. The management of pterygia, with special reference to surgery combined with beta irradiation. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1962;66:776-84.
- Cameron ME. Histology of pterygium: an electron microscopic study. *Br J Ophthalmol*. 1983;67(9):604-8.
- Goodman LS. Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica. 9a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; c1996.
- Arencibia DF, Vidal A, Rosario LA, Suárez YE, Delgado L. Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la medula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *Vaccimonitor*. 2011;20(1):28-33.
- Cronemberger S, Santos DV, Ramos LF, Oliveira ACM, Maestrini HA, Calixto N. Trabeculectomia com mitomicina C em pacientes com glaucoma congênito refratário. *Arq Bras Oftalmol*. 2004;67(3):475-9.
- Costa VP, Vasconcellos JP, Comegno PE, José NK. O uso da mitomicina C em cirurgia combinada. *Arq Bras Oftalmol*. 1999;62(5):577-80.

Autor correspondente:

Juliana Almodin
Rua Silva Jardim, nº 359
CEP 87013-000 – Maringá (PR), Brasil
Tel: (44) 3262 2061
e-mail: juliana_almodin@hotmail.com.br