

Toxicidade da mitomicina C no epitélio corneano de coelhos

Mitomycin C toxicity in the corneal epithelium of rabbits

Nilo Holzchuh¹

Ricardo Holzchuh²

Carlos Eduardo Leite Arieta³

Newton Kara-José⁴

Milton Ruiz Alves⁵

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos do uso tópico da mitomicina C a 0,02%, no epitélio íntegro da córnea de coelhos, sob o ponto de vista histopatológico. **Métodos:** A mitomicina C a 0,02% (olhos esquerdo) e água destilada (olhos direito, controle) foram instiladas, 4 vezes ao dia, por 14 dias, nos olhos de 28 coelhos, na superfície ocular íntegra. Os animais foram sacrificados no 15^o, 50^o e 100^o dia de experimento. O exame histopatológico do epitélio corneano foi complementado por análise morfométrica, que pelo método de contagens de pontos, estudou área do epitélio, número de núcleos, relação núcleo-citoplasma, área da célula epitelial, área do núcleo e área do citoplasma, na região do limbo e central da córnea. **Resultado:** O uso de mitomicina C não desencadeou alterações histopatológicas no epitélio corneano, observando-se a continuidade do epitélio, as células epiteliais se apresentaram dispostas de maneira ordenada, com número de camadas obedecendo a maturação normal e ausência de atipia celular. A análise morfométrica demonstrou alterações significativas nas diferentes estruturas do epitélio, na região do limbo e central da córnea, principalmente nas áreas estimadas do epitélio, do citoplasma e do número de núcleos, verificando-se hipertrofia da célula epitelial, redução da relação núcleo-citoplasma e diminuição do número de núcleos. Estes valores voltaram próximos ao nível controle no 100^o dia de avaliação. **Conclusão:** Os resultados desta investigação demonstraram baixo potencial tóxico do uso da mitomicina C na superfície ocular íntegra de coelhos, nessa dosagem e concentração.

Descritores: Mitomicina/administração & dosagem; Mitomicina/toxicidade; Administração tópica; Soluções oftálmicas/efeitos adversos; Epitélio corneano/efeitos de drogas; Coelhos

INTRODUÇÃO

A córnea e a conjuntiva são tecidos oculares que apresentam maiores concentrações de medicações quando instiladas no olho, sendo as células epiteliais corneais mais susceptíveis aos efeitos citotóxicos cumulativos de drogas⁽¹⁾. Na presença de defeito epitelial da córnea, a mitomicina C (MMC), colocada em contato direto com esta área, provoca retardo de sua reparação em relação a olhos controles e a outras drogas antimetabólicas⁽²⁻³⁾. O filme lacrimal, parte importante na manutenção da turgescência da córnea e um dos principais elementos para boa acuidade visual, recobre a superfície ocular e está intimamente relacionado com o epitélio corneano, também sofre ação deletéria da MMC por diminuição do número de células calciformes⁽⁴⁾.

O emprego da MMC por períodos longos como até 2 semanas, como vem sendo preconizada quando para tratamento de neoplasias intra-epiteliais córneo-conjuntivais, pode ser tóxica para a conjuntiva e córnea poden-

Trabalho realizado na Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, Faculdade de Medicina da USP, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

¹ Chefe da Seção de Lentes de contato da Clínica Oftalmológica da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Chefe da Seção de Córnea da Santa Casa de São Paulo, Doutor em medicina pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

² Residente de 2^o ano em Oftalmologia pela Santa Casa de São Paulo.

³ Chefe da Seção de Catarata da Clínica Oftalmológica da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Professor Livre Docente da Clínica Oftalmológica da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

⁴ Professor Titular em Oftalmologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP e da Universidade de São Paulo - USP.

⁵ Professor Livre Docente das Clínicas Oftalmológicas da Universidade de São Paulo - USP e da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

Endereço para correspondência: Av. Pacaembu, 1358 São Paulo (SP) - CEP 01234-000
E-mail: holzchuh@uol.com.br

Nota Editorial: Pela análise deste trabalho e por sua anuência na divulgação desta nota, agradecemos ao Dr. Eduardo Melani Rocha.

Recebido para publicação em 15.07.2003

Versão revisada recebida em 17.05.2004

Aprovação em 21.05.2004

do acarretar complicações como dor ocular, blefaroespasmos, hiperemia da conjuntiva, erosão corneana e uveítes⁽⁵⁾.

A falta de informações sobre possíveis efeitos adversos relacionados ao uso tópico de MMC motivou a realização deste estudo, onde se pretende avaliar a toxicidade da droga no epitélio corneano íntegro, por meio de análise morfométrica.

MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Investigação Médica (LIM 33) da Clínica Oftalmológica do HCFMUSP, FMV Zootecnia USP, Santa Casa.

Utilizaram-se 24 coelhos da raça Califórnia, espécie, apresentando peso médio de 2.751,07 g ± 423,10 g. Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 lotes (lotes A a D, com 6 animais).

Os olhos direitos dos animais foram medicados com água destilada (olhos-controle), 2 gotas, 4 vezes ao dia, durante 14 dias (animais do lote A receberam água destilada em ambos os olhos) e os olhos esquerdos medicados com colírio de MMC a 0,02% (olhos tratados), na dosagem de 2 gotas, 4 vezes ao dia, por 14 dias.

Os coelhos, no 15º dia (animais dos lotes A e B), no 50º dia (animais do lote C) e no 100º dia (animais do lote D), foram sacrificados e suas córneas retiradas e transferidas para frascos individuais contendo formol tamponado a 10%. Um fio de sutura, de seda preto 4 "0", foi previamente passado no limbo às 12:00 horas, como ponto de referência. Os exames foram executados sem conhecimento prévio do quadro clínico e de que lote de animais provinha o material do estudo. As lâminas foram coradas pelo método de hematoxilina-eosina e submetidas à análise morfométrica.

Para o estudo morfométrico empregou-se o método de contagens de pontos, que utiliza um sistema-teste com pontos fixos e sistematicamente equidistantes ao acaso sobre uma estrutura. O número p de pontos incidentes em um determinado perfil seccional forneceu estimativa direta e não viciada de sua área a ⁽⁶⁾. Esta estimativa $[a]$ é convenientemente expressa nos termos de distância u entre dois pontos adjacentes ao sistema-teste, por meio da seguinte fórmula: $[a] = p \cdot u^2$

A obtenção do valor do coeficiente de erro (CE) na estimativa de áreas $[a]$ por contagem de pontos foi calculado pela fórmula: $CE = SE / M$ onde, SE = erro padrão e M = média.

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

Sob microscopia óptica, no aumento de 400X, foi contado o número de campos não coincidentes do epitélio da córnea pelo retículo do sistema-teste, no sentido das 12:00 às 6:00 horas. Essas medidas permitiram padronizar o local para avaliação do epitélio da córnea. Dez campos foram avaliados na região central e límbica do epitélio corneano. A contagem do número de pontos coincidentes do retículo sistema-teste permitiu avaliar os seguintes parâmetros: área estimada do epitélio, número de núcleos, relação núcleo-citoplasma, área da célula do epitélio e área do citoplasma da célula do epitélio.

Os dados numérico-estatísticos foram apresentados por

meio de médias e desvios padrão. Neste estudo os dados não possuem distribuição gaussiana, utilizaram-se os seguintes testes não paramétricos: prova de Kruskal-Wallis (H) e prova de comparações múltiplas de Scheffé, adotando-se nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Os resultados do estudo morfométrico estão nas tabelas de número 1 a 5.

DISCUSSÃO

Nesta pesquisa houve preocupação de se analisar, por morfometria, diferentes áreas do epitélio e, em todas, foi feito levantamento com amostragem, para se poder estabelecer uma média estatisticamente representativa, com coeficiente de erro sempre inferior a 5% e um resultado mais preciso do estudo histopatológico. Pela análise morfométrica é possível verificar possíveis alterações no epitélio da córnea, uma vez que este método fornece a estimativa da medida de estruturas anatômicas. Um valor morfométrico individual isolado tem pouco significado e é difícil de ser interpretado. Normalmente, as determinações morfométricas são feitas numa dada amostra de estruturas de indivíduos diferentes e obtém-se um resultado que deve representar estatisticamente a média das medidas feitas⁽⁷⁾.

Tabela 1. Valores médios, desvios padrão e resultados da prova de Kruskal-Wallis (H), das estimativas de área do epitélio (μm^2) avaliadas nas regiões límbica e central da córnea nos diferentes lotes de animais

Grupo	Limbo	Central
	Média ± D.P.	Média ± D.P.
CC	22,88 ± 6,55	24,32 ± 7,35
MMC 15d	28,83 ± 13,86	32,88 ± 8,09
MMC 50d	25,87 ± 5,81	29,73 ± 8,74
MMC 100d	21,18 ± 14,07	20,15 ± 8,52

H = 43,55 P<0,0001*(1); H = 73,14 P<0,0001*(2)
(1) e (2) (MMC 100d = CC) ≠ (MMC 50d = MMC 15d)

Tabela 2. Valores médios, desvios padrão e resultados da prova de Kruskal-Wallis (H), das estimativas do número de núcleos avaliados nas regiões límbica e central da córnea nos diferentes lotes de animais

Grupo	Limbo	Central
	Média ± D.P.	Média ± D.P.
CC	33,13 ± 8,27	29,75 ± 4,52
MMC 15d	21,05 ± 9,65	23,95 ± 4,67
MMC 50d	28,88 ± 5,95	27,67 ± 5,17
MMC 100d	31,65 ± 7,37	26,87 ± 6,78

H = 56,57 P<0,0001*(1); H = 38,64 P<0,0001*(2)
(1) MMC 15d ≠ (MMC 50d = MMC 100d = CC)
(2) MMC 15d ≠ (MMC 100d = MMC 50d = CC)

Tabela 3. Valores médios, desvios padrão e resultados da prova de Kruskal-Wallis (H), das estimativas da relação núcleo-citoplasma avaliadas nas regiões límbica e central da córnea nos diferentes lotes de animais

Grupo	Limbo	Central
	Média ± D.P.	Média ± D.P.
CC	0,41 ± 0,14	0,33 ± 0,10
MMC 15d	0,29 ± 0,14	0,28 ± 0,09
MMC 50d	0,33 ± 0,11	0,30 ± 0,08
MMC 100d	0,48 ± 0,14	0,36 ± 0,15

H = 56,25 P<0,0001*(1); H = 18,09 P = 0,0004*(2)
 (1) (MMC 15d = MMC 50d) ≠ (CC = MMC 100d)
 (2) (MMC 15d = MMC 50d = CC) ≠ MMC 100d

Tabela 4. Valores médios, desvios padrão e resultados da prova de Kruskal-Wallis (H), das estimativas de área da célula epitelial (μm^2) avaliadas nas regiões límbica e central da córnea nos diferentes lotes de animais

Lote	Limbo	Central
	Média ± D.P.	Média ± D.P.
CC	21,37 ± 6,11	22,45 ± 7,26
MMC 15d	26,90 ± 13,40	32,27 ± 8,72
MMC 50d	24,15 ± 6,09	27,43 ± 7,98
MMC 100d	19,68 ± 13,62	19,08 ± 8,66

H = 38,17 P<0,0001*(1); H = 72,80 P<0,0001*(2)
 (1) e (2) (MMC 100d = CC) ≠ (MMC 50d = MMC 15d)

Tabela 5. Valores médios, desvios padrão e resultados da prova de Kruskal-Wallis (H), das estimativas de área do citoplasma da célula epitelial (μm^2) avaliadas nas regiões límbica e central da córnea nos diferentes lotes de animais

Grupo	Limbo	Central
	Média ± D.P.	Média ± D.P.
CC	33,13 ± 8,27	29,75 ± 4,52
MMC 15d	21,05 ± 9,65	23,95 ± 4,67
MMC 50d	28,88 ± 5,95	27,67 ± 5,17
MMC 100d	31,65 ± 7,37	26,87 ± 6,78

H = 56,57 P<0,0001*(1); H = 38,64 P<0,0001*(2)
 (1) MMC 15d ≠ (MMC 50d = MMC 100d = CC)
 (2) MMC 15d ≠ (MMC 100d = MMC 50d = CC)

Neste estudo, verificou-se que o uso tópico da MMC determinou alterações morfológicas significativas nas diferentes estruturas do epitélio corneano, nas regiões do limbo e central (Tabelas 1 a 5).

Nos olhos medicados com MMC em relação aos controles, observou-se aumento da área estimada do epitélio corneano límbico e central nas avaliações realizadas aos 15 e 50 dias. (Tabela 1). Esse aumento da área estimada do epitélio corneano límbico e central deveu-se a hipertrofia da célula epitelial por aumento do citoplasma, uma vez que houve diminuição do número de núcleos (Tabelas 2, 4 e 5). A hipertrofia celular por edema ocorre quando as células são incapazes de manter homeostase fluída e iônica⁽⁸⁾. Constitui alteração reversível e

sua morfologia é difícil de ser apreciada com microscópio de luz. Sua presença determina aumento de volume do órgão. Já nos processos reparativos, o aumento do tamanho das células não se deve muito ao edema celular, por ser consequência da síntese de mais componentes estruturais⁽⁹⁾.

A diminuição do número de núcleos e da célula epitelial, (Tabelas 2 e 4) ocorreram pelo efeito antiproliferativo da MMC, que tem atividade contra todas as células, independentemente da fase do ciclo celular, sendo mais intensa na fase final de pré-síntese (G_1) e no início da síntese do DNA (S)⁽¹⁰⁾.

Evidenciou-se redução significativa do valor da relação núcleo-citoplasma das células epiteliais, nas avaliações realizadas no 15º e 50º dia, na região límbica, enquanto houve aumento significativo na região central, nas avaliações realizadas no 100º dia. (Tabela 3) Essas alterações provavelmente são consequências da droga inibir a síntese de DNA e RNA, degradar o DNA pré-formado e causar lise do núcleo celular⁽¹⁰⁾.

A área estimada da célula epitelial e do citoplasma da célula do epitélio corneano, na região do limbo e central, apresentaram aumento no 15º e 50º dia (Tabelas 4 e 5).

As alterações morfológicas significativas que ocorreram nas regiões límbica e central do epitélio da córnea, na maioria dos parâmetros, voltaram a níveis do controle, na avaliação de 100 dias.

Os achados deste estudo evidenciaram presença de alterações morfológicas nas diferentes estruturas analisadas no epitélio da córnea por ação dos efeitos farmacológicos da droga. Foram observadas modificações quando se empregou MMC em superfície ocular íntegra de coelhas, mesmo em baixas doses e por curto espaço de tempo⁽²⁾.

O epitélio corneano tem capacidade de auto-regeneração rápida. Essa peculiaridade se deve às células germinativas localizadas no limbo. Como a MMC induziu alterações morfológicas significativas no epitélio corneano, inclusive no limbo, justifica-se a realização de estudo para avaliação do padrão de diferenciação das células epiteliais da córnea, através da análise imunohistoquímica.

CONCLUSÃO

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

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial a Prof^ª. Dra. Marlene Pezzutti Holzchuh, catedrática de Anestesiologia da FMVZUSP, pela orientação e dedicação neste trabalho.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effects of mitomycin C eye drops (0.2 mg/ml) on the corneal epithelium of rabbits. **Methods:**

Mitomycin C and distilled water (controls) were instilled 4 times daily for 14 consecutive days in the eyes with intact ocular surface. The animals were sacrificed in the 15th, 50th and 100th day of the experiment. The histopathologic analysis of the corneal epithelium was complemented by morphometry. Epithelium area, number of nuclei, nucleus-cytoplasm relation, epithelial cell and cytoplasm area were studied. **Results:** The morphometric analysis was performed by point counting under light microscopy. It showed variations characterized by alteration of the epithelium area, nucleus area and cytoplasm area, epithelial cell hypertrophy, alteration of the nucleus-cytoplasm relationship and decrease of the number of nuclei. **Conclusion:** The results of this investigation, in the study conditions, showed that 0.02% mitomycin C, instilled 4 times daily for 14 consecutive days, has low toxic potential in the intact ocular surface.

Keywords: Mitomycin/administration & dosage; Mitomycin/toxicity; Administration, topical; Ophthalmic solutions/adverse effects; Epithelium, corneal/drug effects; Rabbits

REFERÊNCIAS

1. Burstein NL. Corneal cytotoxicity of topically applied drugs, vehicles and preservatives. *Surv. Ophthalmol.* 1980;25(1):15-30.
2. Alves MR, Saldiva PHN, Lemos M, Kara-José N. Efeitos do uso tópico da mitomicina C no epitélio corneano de coelhas: análise histopatológica pela morfometria. *Arq Bras Oftalmol.* 1996;59(5):431-7.
3. Mattar DB, Alves MR, Silva MHT, Kara-José N. Estudo da influência da aplicação subconjuntival da mitomicina C na reparação de defeito epitelial corneano em coelhas. *Arq Bras Oftalmol.* 1995;58(1):65-7.
4. Holzchuh N, Alves MR, Santo RM, Matayoshi S, Kara-José N. Efeitos do uso do colírio de mitomicina C na superfície ocular de coelhos. *Rev Med. (São Paulo)* 1997;76(6):303-6.
5. Frucht-Pery J, Rozenman Y. Mitomycin C therapy for corneal intraepithelial neoplasia. *Am J Ophthalmol.* 1994;117(2):164-8.
6. Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc.* 1987;147(Pt 3):229-63.
7. Mandarim-de-Lacerda CA. Métodos quantitativos em morfologia. Rio de Janeiro, EDUERJ; 1995. 131p.
8. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Shoen FJ. Cellular injury and cellular death. In: Cotran RS, Kumar V, Collins P. Robbins pathologic basis of disease. 6.ed. Philadelphia: Saunders; 1994. 1425p.
9. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Shoen FJ. Cellular growth and differentiation: normal regulation and adaptations. In: Cotran RS, Kumar V, Collins P. Robbins pathologic basis of disease. 6.ed. Philadelphia: Saunders; 1994. p.1425.
10. Croke ST, Bradner WT. Mitomycin C: a review. *Cancer Treat Rev.* 1976;3(3):121-39.

XXVIII SIMA^{sp} SIMPÓSIO MOACYR E. ÁLVARO

17 a 19 de Fevereiro de 2005
Frei Caneca Shopping & Convention Center
SÃO PAULO - SP

“Olho depois dos 40 anos – Do Básico ao Avançado”

Informações: Centro de Estudos de Oftalmologia “Moacyr E. Álvaro” - CEO
Fone: (11) 5085-2026
E-mail: ceo@oftalmo.epm.br