

Estudo comparativo da ação do tiotepa e da mitomicina C na reparação do epitélio corneano, em coelhas ⁺

A comparative study of the effect of mitomycin C and thio-thepa on superficial epithelial corneal healing in rabbits

Décio de Brong Mattar ⁽¹⁾

Milton Ruiz Alves ⁽²⁾

Mônica Helena Teixeira da Silva ⁽³⁾

Newton Kara José ⁽⁴⁾

RESUMO

Este estudo compara, em coelhas, a influência dos agentes anti-proliferativos, mitocina C e tiotepa, na cicatrização de defeitos epiteliais corneanos. Com a utilização de um cilindro de plástico, foi possível manter por 5 minutos a área de defeito epitelial em contato com 1ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (olhos controles) ou com 1 ml de uma das soluções: mitomicina C 0,02%, mitomicina C 0,04% ou tiotepa 1:2000 (olhos tratados). Dentro das condições desse estudo, conclui-se que a exposição à solução de tiotepa não influencia a reparação da lesão, enquanto a solução de mitomicina C a 0,02% e a 0,04% retardam significativamente a cicatrização da área desepitelizada.

Palavras chave: Mitocina C. Tiotepa. Córnea. Lesão epitelial. Cicatrização. Coelhas.

INTRODUÇÃO

Agentes antimetabólicos, como o tiotepa e a mitomicina C, têm sido empregados com sucesso, na forma de colírio, como terapêutica complementar, para reduzir o número de recidivas pós-operatórias do pterígio ¹⁻⁷. O tiotepa tem sido empregado na concentração de 1:2000, uma gota, seis vezes ao dia, por seis semanas ^{1,2,8}. A mitomicina C tem sido instilada nas concentrações de 0,10% a 0,04%, duas a quatro vezes ao dia, por uma a duas semanas ³⁻⁷. A melhora dos resultados tem sido creditada ao efeito anti-proliferativo dessas drogas nas células com maior taxa de mitose por inibição da síntese de DNA ⁹⁻¹². Como complicações graves decorrentes do uso desses agentes tem sido relatados defeitos epiteliais corneanos, irites severas, necrose de córnea e de esclera e endoftalmites ^{5,8,13,14}. ANDO et al. ¹¹ empregando a mitomicina C nas

concentrações 0,0016%, 0,008%, 0,04 % e 0,20%, demonstraram que a droga a 0,04% e a 0,20%, retarda a cicatrização de defeitos epiteliais corneanos e que o seu efeito é dose relacionado. Não existem relatos na literatura pesquisada do efeito do tiotepa na reparação de lesões epiteliais corneanas. Recentemente, a mitomicina C tem sido empregada, intra-operatoriamente, na exérese do pterígio, a semelhança de seu uso nas cirurgias antiglaucomatosas ^{7,15}, apesar da inexistência de estudos prospectivos, multicêntricos e mascarados que atestem sua eficácia e segurança.

Esta investigação, tem como objetivo avaliar a influência dos agentes antiproliferativos, mitomicina C nas concentrações 0,02% e 0,04% e tiotepa 1:2000 (que são as concentrações usadas clinicamente), na reparação do epitélio corneano, em coelhas.

⁺ Trabalho realizado no Biotério do Serviço de Radiologia do Instituto de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

⁽¹⁾ Médico Assistente pós-graduando da Clínica Oftalmológica do Hospital das Clínicas da FMUSP

⁽²⁾ Médico Assistente Doutor

⁽³⁾ Médica Adida

⁽⁴⁾ Professor Adjunto da Disciplina de Oftalmologia da FMUSP e Professor Titular da Disciplina de Oftalmologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas.

Endereço para correspondência: Dr. Décio de Brong Mattar. Rua Itapeva, 490 - cj.92 - CEP 01332-000. São Paulo. Fone 289-2451.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 21 coelhas albinas de raça Nova Zelândia, pesando entre 1600 e 2150 g, sem anormalidades detectadas ao exame inicial com lâmpada de fenda, divididas em três lotes de sete animais. As coelhas foram anestesiadas com injeção intra-muscular de uma mistura de cloridrato de ketamina na dose de 30 mg/kg de peso e de xilazina na dose de 5mg/kg de peso. Após a irrigação dos olhos com solução de cloreto de sódio 0,90% e instilação de 2 gotas de tetracaína 0,5%, realizaram-se em todos os olhos defeitos superficiais na porção central da córnea. A demarcação da área a ter o epitélio removido foi feita, sob magnificação, com trépano de 7,75mm. O epitélio a ser removido foi tocado por aproximadamente 30 segundos por uma zaragatoa embebida em álcool etílico 95% e, posteriormente, secado e finalmente irrigado com solução de cloreto de sódio 0,9%. O epitélio na área demarcada foi removido com bisturi lâmina 15. A eficácia da ablação epitelial foi controlada com a instilação de 2 gotas de fluoresceína sódica a 2%. Com a utilização de um cilindro de plástico, com cerca de 14mm de diâmetro interno e 2,5cm de altura, foi possível

manter, por cinco minutos, a área do defeito epitelial em contato com 1ml de solução de cloreto de sódio a 0,9% (olhos direitos - controles) ou com 1ml de solução de mitomicina C a 0,02% (olhos esquerdos do lote 1), 1ml de mitomicina C a 0,04% (olhos esquerdos do lote 2) ou com 1ml de solução de tiotepa a 1:2000 (olhos esquerdos do lote 3). Estas medicações foram preparadas pela Farmácia Ophthalmos e até seu uso foram mantidas sob refrigeração e ao abrigo da luz.

Para avaliação da regeneração epitelial, a área corneana sem epitélio, foi corada com fluoresceína sódica a 2% e fotografada nos tempos 0, 6 e 20 horas após e, a partir daí, a cada 12 horas até a cicatrização, com um sistema de macrofotografia (lente macro de 100mm-Ashai Pentax, foco de 45 cm, flash eletrônico Toshiba-modelo 8184 com filtro Wratten Kodak 47 B e filme Kodacolor Gold 100 ASA). Após identificação na fotografia, a área sem epitélio foi medida com o auxílio de uma câmara de vídeo acoplada a um sistema analisador de imagem (JAVA 1,4), digitando-se sua imagem num vídeo de alta resolução, equipado com "mouse".

Para a avaliação quantitativa da regeneração do epitélio corneano, a área

inicial de ablação epitelial foi considerada igual a 100% e áreas percentuais sem epitélio foram calculadas nos tempos anteriormente referidos.

O epitélio regenerado foi avaliado biomicroscopicamente quando da cicatrização do defeito epitelial, procurando-se identificar a presença de edema epitelial visível por retro-iluminação e/ou iluminação direta além de opacificação grosseira e presença de irregularidades.

Para a análise dos resultados foram empregados médias aritméticas, desvios padrão, regressões lineares, prova de Mann-Whitney, teste de Wilcoxon e construção de figuras com os valores das médias aritméticas.

RESULTADOS

Os valores médios e desvios padrão dos coeficientes angulares calculados das curvas de cicatrização, os resultados de comparação entre os olhos controles e os medicados pelo teste de Wilcoxon e os resultados de comparação entre os olhos controles e os medicados com ambas as concentrações de mitomicina pela prova de Mann-Whitney, obtidos dos três lotes de animais, estão na Tabela. A mitomicina C a 0,02% e a 0,04% retardou a reparação do defeito epitelial e nessas concentrações o efeito foi dose relacionado. O tiotepa a 1:2000 não influenciou a cicatrização da área de ablação epitelial.

As representações gráficas da função da área desepitelizada pelo tempo em que foram avaliadas nos olhos controles e nos olhos medicados, obtidas de cada lote de animais, estão nas Figuras 1 a 3. Enquanto nos olhos controles e nos medicados com tiotepa os defeitos epiteliais cicatrizaram entre 44 e 56 horas, nos olhos tratados com mitomicina C a 0,02% e a 0,04%, a reparação da lesão ocorreu entre 80 e 92 horas.

Nos olhos tratados com mitomicina C a 0,02% ou a 0,04% foi evidenciado

Tabela

Valores médios (VM) e desvios padrão (dp) dos coeficientes angulares calculados das curvas de cicatrização, número de olhos (N), resultados da comparação entre os olhos controles e os medicados com mitomicina C (MMC) e com tiotepa (TT) pelo teste de Wilcoxon (Z e P) e resultados da comparação entre os olhos controles e entre os medicados com mitomicina C pela Prova de Mann-Whitney (U e P), obtidos dos animais dos 3 lotes.

LOTE	OLHOS	VM ± dp	MEDIANA	N	COMPARAÇÃO
1	Controle	-2,23 ± 0,36	-2,10	7	Z = -2,37
	MMC 0,02%	-1,34 ± 0,19	-1,34	7	P = 0,0180*
2	Controle	-2,11 ± 0,25	-2,14	7	Z = -2,37
	MMC 0,04%	-1,08 ± 0,16	-1,11	7	P = 0,0180*
3	Controle	-2,06 ± 0,17	-2,06	7	Z = -0,17
	TT 1:2000	-2,06 ± 0,19	-2,11	7	P = 0,8658
1	Controle	-2,23 ± 0,36		7	U = 24,0
2	Controle	-2,11 ± 0,25		7	P = 1,0000
1	MMC 0,02%	-1,34 ± 0,19		7	U = 6,0
2	MMC 0,04%	-1,08 ± 0,16		7	P = 0,0175*

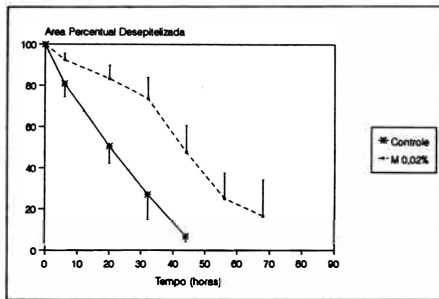


Figura 1 - Representação gráfica das variações de porcentagem de área desepitelizada obtidas dos valores médios dos olhos controles (solução de cloreto de sódio 0,9%) e dos medicados (solução de mitomicina a 0,02%), na avaliação inicial e em diversas fases do tempo, dos animais do lote 1.

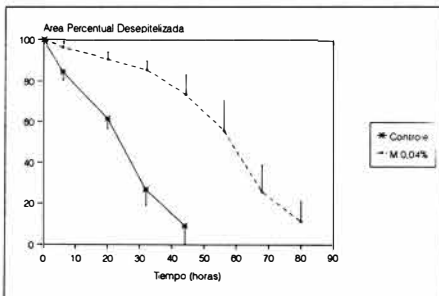


Figura 2 - Representação gráfica das variações de porcentagem de área desepitelizada obtidas dos valores médios dos olhos controles (solução de cloreto de sódio 0,9%) e dos medicados (solução de mitomicina a 0,04%), na avaliação inicial e em diversas fases do tempo, dos animais do lote 2.

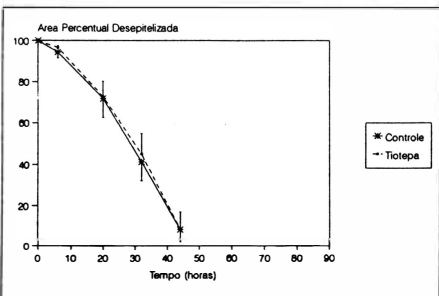


Figura 3 - Representação gráfica das variações de porcentagem de área desepitelizada obtidas dos valores médios dos olhos controles (solução de cloreto de sódio 0,9%) e dos medicados (solução de tiotepa a 1:2000), na avaliação inicial e em diversas fases do tempo, dos animais do lote 3.

no epitélio regenerado edema visível por ambas as iluminações (retro-iluminação e iluminação direta), presença de opacificação grosseira e irregularidade de sua superfície. Nos olhos controles e nos tratados com

tiotepa, identificou-se no epitélio regenerado edema visível apenas por retro-iluminação, transparência do tecido e ausência de irregularidades superficiais.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que a exposição de uma área corneana sem epitélio com uma solução de mitomicina C a 0,02% ou a 0,04%, durante cinco minutos, retarda significativamente a reparação dessa área e que os efeitos são dose relacionados. Estes achados são concordantes com os de ANDO et al.¹¹, resultantes de estudo em coelhos, com o emprego da droga nas concentrações 0,0016%, 0,008%, 0,04% e 0,2%. Nesta investigação empregamos as concentrações da droga utilizadas clinicamente. JAMPEL¹⁰ demonstrou, *in vitro*, que um minuto de exposição dos fibroblastos obtidos da cápsula de Tenon de seres humanos, poderia ser tão efetivo quanto uma exposição de cinco minutos, no que se refere ao aumento de filtração de uma cirurgia antiglaucomatosa. Tal efeito ocorreria não por citotoxicidade aniquilando os fibroblastos mas por inibição de sua proliferação. KHAW et al.¹² demonstraram, biopsiando tecidos subconjuntivais e esclerais previamente expostos por cinco minutos a mitomicina C a 0,04% e colocados em meio de cultura de tecidos, que a taxa de crescimento de fibroblastos se mantinha alterada por no mínimo 30 dias. Estas alterações ocorreram apenas nas áreas expostas à medicação. Tais achados permitem conjecturar que o uso intra-operatório da droga na cirurgia do pterígio provocaria inibição da proliferação de fibroblastos restritamente na área de remoção conjuntival da lesão onde ocorreu exposição à droga. Em contraste, o emprego da solução de tiotepa a 1:2000 não interferiu na cicatrização epitelial do defeito corneano. Tal resultado pode estar re-

lacionado com a diferença de potência entre as drogas estudadas. ROBERTSON & CREASMAN¹⁶, empregando tiotepa na concentração de 1:445, em ratos por período de 6 semanas, usando o olho contralateral de controle, observaram alterações do epitélio corneano e catarata unilateral em todos os 19 animais tratados. Utilizando diferentes concentrações da droga, concluíram serem as alterações corneanas e cristalínicas dose relacionadas. ALVES et al.¹⁷ relatam um caso de complicação ocular grave irreversível, associado à utilização pós-operatória do tiotepa que inicialmente manifestou-se por dificuldade de epitelização corneana arrastando-se além do octagésimo dia de pós-operatório.

Atualmente, a ocorrência de complicações graves, muitas vezes tardias, tem determinado uma diminuição da dose inicialmente preconizada para o uso tópico da mitomicina C no pós-operatório de pterígio^{3,5,13} e as indicações de seu uso em cirurgias antiglaucomatosas parece buscar indicações mais restritas¹⁸. A indicação do uso intra-operatório da mitomicina C em cirurgias de pterígio necessita ainda de avaliação quanto a sua efetividade e segurança.

SUMMARY

This study was carried out to evaluate the effect of the antiproliferative agents, mitomycin C and thio-thepa, on epithelial wound healing in the rabbit cornea.

Using an eye cup made of plastic, the corneal epithelium defects were bathed for 5 minutes with either mitomycin C (in concentrations of 0.02% and 0.04%) and thio-thepa 1:2000. The contralateral fellow eyes, were bathed in balanced salt solution in the eye cup and served as controls.

Thio-thepa 1:2000 has not influenced reepithelialization. When used mitomycin C in

concentrations of 0.02% and 0.04%,
were delayed reepithelialization of
corneal defects.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 KLEISS, W.; PICÓ, G. - Thiotepa therapy to prevent pos-operative pterygium recurrence and neovascularization. *Am. J. Ophthalmol.*, 76:371-3, 1973.
- 2 GONÇALVES, J.O.R.; MAGALHÃES, M.M. - O uso do Tiotepa no pós-operatório do pterígio e outras neoplasias conjuntivais. *Rev. Bras. Oftalmol.*, 33:829-39, 1974.
- 3 HAYASAKA, S.; NODA, S.; YAMAMOTO, Y.; SETOGAWA, T. - Postoperative instillation of low-dose mitomycin C in the treatment of primary pterygium. *Am. J. Ophthalmol.*, 106:715-8, 1988.
- 4 SINH, G.; WILSON, M.R.; FOSTER, C.S. - Mitomycin eye drops as treatment for pterygium. *Ophthalmology*, 95:813-20, 1988.
- 5 SUGAR, A. - Who should receive mitomycin-C after pterygium surgery? *Ophthalmology*, 99:1645-6, 1992.
- 6 MAHAR, P.S.; NWOKORA, G.E. - Role of mitomycin in pterygium surgery. *Brit. J. Ophthalmol.*, 77:33-5, 1993.
- 7 MARTINELLI NETO, G.; SOUTO, A.C.; FIGUEIREDO, R.S. - Mitomicina C como adjuvante à cirurgia do pterígio. *Arq. Bras. Oftalmol.*, 56:180, 1993.
- 8 ALVES, M.R. - Contribuição ao estudo dos efeitos locais do tiotepa no pós-operatório do pterígio. *Arq. Bras. Oftalmol.*, 53:203-9, 1990.
- 9 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.
- 10 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.
- 11 ANDO, H.; OIDO, T.; KAWAI, Y.; YAMAMOTO, T.; KITAWA, Y. - Inhibition of corneal epithelial wound healing. A comparative study of mitomycin C and 5-fluorouracyl. *Ophthalmology*, 99:1809-14, 1992.
- 12 KHAW, P.T.; DOYLE, J.W.; SHERWOOD, M.B.; GRIERSON, I.; SHULTZ, G.; MCGORRAY, S. - Prolonged localized tissue effects from 5-minute exposures to fluorouracil and mitomycin C. *Arch. Ophthalmol.*, 111:263-7, 1993.
- 13 RUBINFELD, R.S.; PFISTER, R.R.; STEIN, R.M.; FOSTER, C.S.; MARTIN, N.F.; STOLLERU, S.; TALLEY, A.R.; SPEAKER, M.G. - Serious complications of topical mitomycin C after pterygium surgery. *Ophthalmology*, 99:1647-54, 1992.
- 14 FUJITANI, A.; HAYASAKA, S.; SHIBUYA, Y.; NODA, S. - Corneoscleral ulceration and corneal perforation after pterygium excision and topical mitomycin C therapy. *Ophthalmologica*, 207:162-4, 1993.
- 15 CARDILLO, J.A.; ALVES, M.R.; KARA-JOSÉ, N.; CAMARGO, J.C.F.; SERPA, J.F.; AMBRÓSIO, L.A.; MOREIRA FILHO, D.C. - Eficácia da mitomicina C na prevenção de recidivas pós-operatórias do pterígio primário: aplicação subconjuntival intra-operatória versus pós-operatória. *Em publicação*.
- 16 ROBERTSON, D.M.; CREASMAN, J.P. - Effects of topical thio-tepa on rat eyes. *Am. J. Ophthalmol.*, 73:73-7, 1972.
- 17 ALVES, M.R.; GAIOTTO Jr.; KARA-JOSÉ, N. - Pterígio e tiotepa - Relato de um caso com complicação irreversível. *Arq. Bras. Oftalmol.*, 44:164-7, 1981.
- 18 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. *Brit. J. Ophthalmol.*, 77:693-7, 1993.

XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE OFTALMOLOGIA

CENTRO DE CONVENÇÕES - BAHIA

5 A 8 DE SETEMBRO DE 1995

COMISSÃO EXECUTIVA:

PRESIDENTE:

Roberto Marback

VICE-PRESIDENTES:

Carlos Aldir Pinheiro

Eduardo Príncipe de Oliveira

Nilson Ferreira Gomes

SECRETÁRIO GERAL:

Epaminondas Castelo Branco Neto

1º SECRETÁRIO:

Paulo Afonso Batista dos Santos

2º SECRETÁRIO:

Danilo Cruz Sento Sé

TESOUREIRO GERAL:

Dilson Fernandes Filho

1º TESOUREIRO:

Edimar Martins Ferreira

2º TESOUREIRO:

Edelzuíta Caminha Castro

PRESIDENTE DE HONRA:

Jacó Lavinsky

HOMENAGEADOS DE HONRA:

Daudete Gonçalves Pastor

Humberto de Castro Lima

Fernando Príncipe de Oliveira