

Fibronectina tópica no tratamento de úlcera de córnea de coelho após queimadura por álcali.

Topical fibronectin in the treatment of the corneal alkali ulceration in rabbits.

Etsuko Kawano Mori ⁽¹⁾
Paulo Sergio de Moraes Barros ⁽²⁾
Anita Hilda Straus Takahashi ⁽³⁾

RESUMO

Foi estudada a epitelização de úlcera de córnea por queimadura por álcali, com o uso tópico de fibronectina purificada de plasma de coelho.

Queimadura por álcali, utilizando-se disco de papel de filtro com diâmetro de 8,0 mm embebidos em NaOH 1N, foi realizada em 30 olhos de 15 coelhos albinos.

O olho direito foi tratado com fibronectina tópica e o esquerdo com tampão fosfato salina (PBS) instilados 5 vezes ao dia.

Não houve diferença entre o grupo tratado com fibronectina e o controle nos 1º, 5º e 11º dia após a lesão.

O tratamento com fibronectina promoveu, após 30 dias, epitelização completa em 5 de 6 animais tratados, estatisticamente significativa ($P < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.

Palavras-chave: Fibronectina, queimadura por álcali, úlcera de córnea

INTRODUÇÃO

A palavra fibronectina origina-se do latim fibra-fibra e nectere-conectar, ligar ⁽¹⁾.

A fibronectina é uma glicoproteína formada por dois polipeptídeos de 220.000 e 230.000 daltons cada ^(1,2). As duas cadeias de polipeptídeos são ligadas por pontes de sulfeto, sendo que uma cadeia de polipeptídeos consiste de 5 domínios e a outra de 6 domínios ⁽²⁾ (fig. 1)

A fibronectina está presente no organismo sob duas formas: como fibronectina plasmática, solúvel e fibronectina celular, insolúvel ⁽¹⁾.

A concentração de fibronectina plasmática em indivíduos normais é de 0,2 a 0,4 mg/ml ⁽³⁾.

A fibronectina tem como característica a propriedade de se ligar através de seus diferentes domínios ao colágeno, a

fibrina, a heparina, a actina, ao *Staphylococcus aureus* e a receptores específicos existentes na superfície de células ⁽¹⁾. Por causa dessa propriedade, possui a capacidade de mediar a adesão, o espreadimento e a migração celular, como demonstraram Nishida et al. ⁽⁴⁾ e Watanabe, Nakagawa, Nishida ⁽⁵⁾.

O domínio, que se liga a receptores celulares, possui o pentapeptídeo GRGDS (glicina-arginina-glicina-ácido-aspartico-serina), responsável pela ligação ⁽⁶⁾ (fig. 1).

Nishida desde 1982 vem administrando, com sucesso, fibronectina, autóloga,

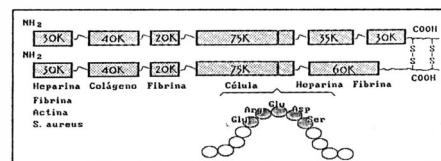


Figura 1 - Esquema geral da molécula de fibronectina com seus domínios. Gly-Arg-Gly-Asp-Ser é a sequência de pentapeptídeos presente no domínio celular responsável pela ligação ao receptor celular.

⁽¹⁾ Pós-graduanda (mestrado) do Departamento de Oftalmologia da Escola Paulista de Medicina

⁽²⁾ Professor associado do Departamento de Cirurgia responsável pelo Serviço de Oftalmologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

⁽³⁾ Professora do Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina

Trabalho realizado no Departamento de Oftalmologia em colaboração com o Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina

Endereço para correspondência: Dra. Etsuko Mori - Rua Alfredo Pujol, 1524 - 02017 - São Paulo - SP

purificada de sangue, topicamente em tratamento de pacientes com defeito epitelial de córnea persistente e erosão recorrente⁽⁶⁾. McCluskey, Wakefield, York⁽⁷⁾ também confirmaram a eficácia do tratamento de úlcera de córnea persistente, resistente ao tratamento convencional, com uso de fibronectina, autóloga, topicamente em casos de defeito epitelial pós-transplante, penfigóide, ceratite herpética, síndrome de Sjogren e úlcera trófica.

Uma das causas de defeito epitelial persistente de córnea é a queimadura por álcali. Acredita-se que nesse caso a regulação do sistema de epitelização e cicatrização não funciona corretamente, levando a aumento da secreção e atividade do ativador de plasminogênio resultando numa fraca e pequena adesão do epitélio a fibrina e fibronectina adjacente e consequentemente defeito epitelial⁽⁸⁾.

O objetivo desse trabalho é avaliar a eficácia da fibronectina quando usada topicamente, em úlceras de córnea de coelho após queimadura experimental por álcali.

MATERIAL E MÉTODO

Purificação de fibronectina

Fibronectina foi purificada de plasma fresco de coelho obtido de sangue citratado centrifugado a 3.000 rpm, por 30 minutos a 4°C, por coluna de afinidade em Sepharose-gelatina segundo o método descrito por Engvall e Ruoslahti⁽⁹⁾ modificado.

A solução de fibronectina foi esterilizada utilizando-se filtros 0,22 µm (Corning) e aliquoteada em frascos estéreis de colírio, e conservados a -70°C até o momento do uso.

Amostra do material foi submetido a eletroforese em gel, mostrando estar puro.

Produção da lesão de córnea

Os animais foram anestesiados com associação de hidrocloreto de ketamina (0,5 ml/Kg/peso) e solução aquosa a 2% de cloridrato de xilazina (0,5 ml/kg/peso) por via intramuscular e instilação tópica de cloridrato de proparacaína 1% em cada olho.

Foram realizadas queimaduras corneais com disco de papel de filtro, de 8,0 mm de diâmetro, embebidos em NaOH 1N que foram colocados em contato com as córneas por 1 minuto, na sua porção superior incluindo região limbal. Imediatamente após os olhos foram lavados com solução de NaCl 0,9% durante 2 minutos.

Tratamento

Após 3 horas, da queimadura por álcali, foi iniciado o tratamento no olho direito de cada animal com 1 gota de fibronectina (0,5mg/ml) e no olho esquerdo, usado como controle, com 1 gota de solução de PBS, instilados ambos os olhos, 5 vezes ao dia.

Avaliação clínica

Os olhos foram examinados diariamente utilizando-se fluoresceína 2% tópica, microscópio cirúrgico e filtro azul. Entretanto, foram considerados para estudo estatístico somente os exames correspondentes aos 1º (15 animais), 5º (12 animais), 11º (9 animais) e 30º (6 animais) dias após lesão por álcali. Foram considerados sem defeito epitelial os olhos que não coraram com fluoresceína.

Avaliação anátomo-patológica

Os animais foram sacrificados em grupos de 3 nos 1º, 5º, 11º dias e de 6 no 30º dia após a queimadura por álcali, com injeção intravenosa de pentobarbital sódico. Os olhos foram enucleados, fixa-

dos em solução de formalina a 10%. faixas de tecido corneal, de aproximadamente 3 mm de largura, na direção das 12 às 6 horas, incluindo área central da lesão e córnea normal, foram submetidas ao processamento histológico rotineiro para inclusão em parafina. Somente um corte de 5 µm de cada faixa foi realizado e depois corado pela técnica da hematoxilina-eosina.

Análise estatística

Os resultados da avaliação clínica foram analisados pelo teste exato de Fischer, utilizando o programa Epi Info versão 3 (STATCALC). Para rejeição da hipótese de nulidade, escolheu-se nível de significância (alfa) de 5%.

RESULTADOS

Nos 1º, 5º e 11º dias após a queimadura por álcali tanto os olhos tratados com fibronectina como os olhos dos grupos controles apresentaram defeito epitelial de córnea (tabela 1).

No 30º dia após lesão por álcali, 5 (83,33%) dos olhos tratados com fibronectina estavam totalmente cicatrizados e 1 dos olhos ainda apresentava lesão epitelial. Dos olhos tratados com PBS apenas 1 (16,67%) apresentava cicatrização da lesão epitelial e 5 apresentavam defeito epitelial (tabela 1).

Não houve diferença entre os grupos tratados com fibronectina e os grupos

TABELA I

Resultados da avaliação de epitelização de córnea de coelho, 1, 5, 11 e 30 dias após queimadura por álcali, de olhos tratados com solução de fibronectina (0,5mg/ml) e de olhos tratados com PBS (ambos os olhos com 1 gota, 5 vezes ao dia), com fluoresceína tópica 2%.

Nº de dias após queimadura	OD tratado com FN (%)	OE tratado com PBS (%)
1	0	0
5	0	0
11	0	0
30	83,33	16,67
Total	83,33	16,67

Teste Exato de Fischer p = 0,04

OD - olho direito - OE - olho esquerdo - FN - fibronectina - PBS - tampão fosfato

controle nos 1º, 5º e 11º dias após a lesão por álcali. Houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,04$) entre o grupo tratado com fibronectina e o grupo controle no 30º dia após a lesão por álcali.

O estudo histológico demonstrou necrose profunda atingindo até camada de Descemet das córneas dos animais dos grupos tratados com fibronectina e dos grupos controles com exceção de 1 caso tratado com fibronectina até o 11º dia.

Nas córneas dos grupos tratados com fibronectina, o processo inflamatório foi mais intenso do que nas dos grupos controles até 11º dia, e menor a partir de então. Até o 11º dia após a lesão por álcali, o processo inflamatório observado nos dois tipos de grupos foram às custas de neutrófilos, enquanto que depois desse período havia maior presença de eosinófilos e linfócitos. A presença de vascularização da córnea ocorreu nos 2 grupos do 30º dia.

COMENTÁRIOS

Queimadura de córnea por álcali costuma ser de difícil tratamento principalmente pela ação progressiva que a base desempenha no tecido corneal e tecido adjacente⁽¹⁰⁾.

Chung et al.⁽¹¹⁾ observaram, em estudo preliminar, que variando o tamanho do diâmetro de papel de filtro e o tempo de exposição da córnea ao álcali, poderiam obter lesões de córnea que não cicatrizavam espontaneamente nem evoluíam para perfuração. Eles escolheram então, papel de filtro de 5,5 mm de diâmetro embebidos em NaOH 1N, colocados em contato com a córnea por 60 segundos seguido de lavagem com NaCl 0,9% por 2 minutos.

Vários outros modelos são descritos utilizando-se diâmetros de papel de filtro, concentrações de NaOH e tempo de exposição diferentes.

Em nosso estudo o modelo escolhido foi obtido utilizando-se papel de filtro de 8,0 mm de diâmetro, embebido em NaOH 1N, colocado em contato com a córnea

durante 60 segundos, incluindo parte do limbo, para se aproximar ao máximo de uma situação clínica comum nos casos de queimadura por álcali ou seja o defeito epitelial persistente.

Objetivando avaliar a eficácia do uso de fibronectina tópica como medida terapêutica no defeito epitelial de córnea após queimadura por álcali, somente nos interessava saber, nos diferentes tempos, se havia cicatrização completa ou não e para isso o teste simples através da coloração com fluoresceína 2% e observação com filtro de azul cobalto foram suficientes.

No presente estudo não foram observados casos de perfuração corneal, infecção secundária, descemetocelose ou calcificações como descrevem Matsuda & Smelser⁽¹²⁾, Pfister & Burstein⁽¹³⁾ e Chung et al.⁽¹¹⁾.

Quanto ao estudo histológico, pudemos observar necrose profunda (até camada de Descemet), na maioria dos casos, nos dois grupos. A partir do 5º dia após a lesão química, havia presença de camada de epitélio cobrindo parcialmente a área de necrose.

O uso de fibronectina em defeito epitelial persistentes de córnea é relatado com sucesso por vários autores^(6, 7, 14).

Nishida⁽⁶⁾ relata tempo médio de cicatrização de 17 dias. Newton et al.⁽¹⁵⁾, com modelo experimental diferente, provocaram queimadura química de córnea de coelho com ácido e demonstraram que o uso de fibronectina tópica não promove epitelização.

No presente estudo, até o 11º dia após a lesão por álcali não foi observado cicatrização em nenhum dos casos. Somente 30 dias após a queimadura, o grupo tratado com fibronectina apresentava 5 olhos epitelizados e o grupo tratado com PBS apenas 1.

Segundo Phan et al.^(16,17) quando a lesão de córnea é mais superficial, com a manutenção de membrana basal, a cicatrização ocorre com ou sem o uso tópico de fibronectina, já que as células adjacentes à lesão teriam capacidade de produzir fibronectina. Assim, seu uso é indicado

em lesões graves onde não há presença de membrana basal, ou onde as células adjacentes à lesão não conseguem produzir fibronectina.

Acreditamos que a gravidade da lesão por álcali provocada, no presente estudo, pode ter tido influência no tempo de cicatrização e na ação da fibronectina utilizada topicamente. A diferença de epitelização ocorreu somente no 30º dia após a lesão, talvez pela dificuldade da fibronectina usada topicamente, atuar na lesão. Sabemos que nessas condições a quantidade de plasmina no local da lesão é grande e ela poderia degradar parcialmente a molécula de fibronectina inativando-a⁽⁸⁾. Além disso, fragmentos de fibronectina com o domínio responsável pela ligação celular, em concentrações altas podem saturar os receptores celulares impedindo a adesão e migração do epitélio^(3,8).

Consideramos necessário estudos posteriores, associando métodos terapêuticos como por exemplo o uso de aprotinina com fibronectina em úlceras após queimaduras por álcali.

SUMMARY

Bilateral alkali burns of the cornea were produced in 15 albino rabbits using the disc of filter paper, 8,0 mm in diameter that was soaked in 1N NaOH.

The right eyes were treated with a drop of purified fibronectin and the left eyes with a drop of phosphate-buffered saline (PBS), 5 times a day.

No difference was found between the group treated with fibronectin and PBS on the 1st, 5th and 11th day after the wound. On the 30th day after the wound 83.33% of fibronectin-treated eyes and 16.67% of PBS-treated eyes were completely healed. This is significant at $p = 0.04$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EIFERMAN, R. A.; FLAHERTY, K.; DELMAGE, J. M.; HARNER, C. - Fibronectin. *Ophthalmology Clinics of North America*, vol.2, 1989. p. 25-38.

*Fibronectina tópica no tratamento de
úlcera de córnea de coelho após
queimadura por álcali.*

2. YAMADA, K. M.; AKIYAMA, S. K.; HAEGAWA, T.; HAEGAWA, E.; HUMPHRIES, M.; KENNEDY, D. W. - Recent advances in research on fibronectin and other cell attachment proteins. *J. Cell Biochem.*, 28:79-97, 1985.
3. YAMADA, K. M. & KENNEDY, D. W. - Dualistic nature of adhesive protein function: fibronectin and biologically active peptide fragments can autoinhibit fibronectin function. *J. Cell Biol.*, 99: 29-36, 1984.
4. NISHIDA, T.; NAKAGAWA, S.; AWATA, T.; OHASHI, Y.; WATANABE, K.; MANBE, R. - Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ. *J. Cell Biol.*, 97:1653-7, 1983.
5. WATANABE, K.; NAKAGAWA, S.; NISHIDA, T. - Stimulatory effects of fibronectin and EGF on migration of corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 28: 205-11, 1987.
6. NISHIDA, T. - Role of fibronectin in corneal epithelial wound healing. In: CAVANAGH, H. D. - *The Cornea. Transaction of the World Congress on the cornea III*, New York, Raven Press, Ltd, 1988. p.619-25.
7. McCLUSKEY, P.; WAKEFIELD, D.; YORK, L. - Topical fibronectin therapy in persistent corneal ulceration. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.*, 15(4):257-62, 1987.
8. BERMAN, M.; KENYON, K.; HAYASHI, K.; L'HERNAULT, N. - The pathogenesis of epithelial defects and stromal ulceration. In: CAVANAGH, H. D., - *The cornea. Transaction of the World Congress on the Cornea III*, New York, Raven Press, Ltd, 1988, p.35-43.
9. ENGVALL, E. & RUOSLAHTI, E. - Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int. J. Cancer*, 20:1-5, 1977.
10. McCULLEY, J. P. - Chemical injuries. In: SMOLIN, G. & THOFT, R. A. - *The Cornea*. 2.ed. Boston, Little, Brown and Company, 1987. p.527-42.
11. CHUNG, J.; FAGERHOLM, P.; LINDSTROM, B. - The behaviour of corneal epithelium following a standardized alkali wound. *Acta Ophthalmol.*, 65:529-37, 1987.
12. MATSUDA, H.; SMELSER, G. K. - Epithelium and stroma in alkali-burned corneas. *Arch. Ophthalmol.*, 89:396-401, 1973.
13. PFISTER, R. R. & BURTEIN, N. - The alkali burned cornea I. epithelial and stromal repair. - *Exp. Eye Res.*, 23:519-35, 1976.
14. PHAN, T. M.; FOSTER, C. S.; BORUCHOFF, S. A.; ZAGACHIN, L. M.; COLVIN, R. B. - Topical fibronectin in the treatment of persistent corneal epithelial defects and trophic ulcers. *Am. J. Ophthalmol.*, 104:494-501, 1987.
15. NEWTON, C.; HATCHELL, D. L.; KLINTWORTH, G. K.; BROWN, C. F. - Topical fibronectin and corneal epithelial wound healing in the rabbit. *Arch. Ophthalmol.*, 106:1277-9, 1988.
16. PHAN, T. M.; FOSTER, C. S.; WASSON, P. J.; FUJIKAWA, L. S.; ZAGACHIN, L. M.; COLVIN, R. B. - Role of fibronectin and fibrinogen in healing of corneal epithelial scrape wounds. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 30(3):377-85, 1989a.
17. PHAN, T. M.; FOSTER, C. S.; ZAGACHIN, L. M.; COLVIN, R. B. - Role of fibronectin in the healing of superficial keratectomies in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 30(3):386-91, 1989b.



T & M Equipamentos Médicos Ltda.

Av. Prestes Maia, 241 - 8º andar - salas 815/ 817
CEP 01031 - 001 - São Paulo - SP

Responsáveis: Miguel Toro Aguilar e Antônio Paulo Moreira

**REPRESENTANTES EXCLUSIVOS
PARA O BRASIL DAS EMPRESAS:**

- **MARCO OPHTHALMIC INC. - USA**
Lâmpadas de fenda - Refractor - Ceratômetro -
Lensômetro - Microscópios cirúrgicos - Perímetros
Yag Laser e Auto perímetro
- **SONOMED INC. - USA**
Completa linha de ultrassons para oftalmologia:
Biômetros - Egógrafo e Paquímetro
- **KONAN CAMERA RESEARCH - JAPAN**
Microscópios cirúrgicos - Microscópio Specular
e Cell Analysis System
- **EAGLE - Lentes intraoculares**

DISTRIBUIDORES PARA O BRASIL:

- **HGM - MEDICAL LASER SYSTEMS**
Completa linha de Argon Laser e Yag Laser
- **NIKON OPHTHALMIC INSTRUMENTS**
Auto-refrator - Camera retinal - Tonômetro de
aplanção e demais equipamentos oftalmológicos
- **WELCH ALLYN**
Retinoscópios - Oftalmoscópios - etc.

NACIONAIS:

- **XENÔNIO**
- **SIOM**

**NOVOS
TELEFONES**

Assistência Técnica: completa para os equipamentos das empresas representadas.

Solicite atendimento ou informações:

São Paulo: T & M - tel.: (011) 229-0304 - Fax: (011) 229-6437

Disk Lentes - tels.: (011) 227-1512/ 228-5448

Ribeirão Preto: Disk Lentes - tel.: (016) 635-2943 - Fax: (016) 636-4282