MARCELO VIEIRA NETTO

**Efeitos do uso tópico da mitomicina C na
prevenção e tratamento da opacidade
corneana em coelhos submetidos à
ceratectomia fotorrefrativa**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Newton Kara José

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Netto, Marcelo Vieira

Efeitos do uso tópico da mitomicina C na prevenção e tratamento da opacidade corneana em coelhos submetidos à ceratectomia fotorrefrativa / Marcelo Vieira Netto. -- São Paulo, 2007.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Área de concentração: Oftalmologia.

Orientador: Newton Kara José.

Descritores 1.Mitomicina 2.Ceratectomia fotorrefrativa por excimer laser
3.Ceratomileuse assistida por excimer laser in situ 4.Córnea 5.Opacidade da córnea

USP/FM/SBD-238/07

*“Nunca se limite a andar pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até onde os outros foram...”*

Grahan Bell

DEDICATÓRIA

À minha esposa, **Priscilla**, meu único e verdadeiro amor. Sua nobreza e pureza de espírito me ensinam, inspiram e fortalecem! Obrigado pelo apoio nas horas difíceis, pela alegria nas vitórias e pelo carinho e companheirismo constantes!

Aos meus pais, **Paulo e Sílvia**, pela educação e incentivo permanentes.

Ao meu pai, pelo exemplo de dedicação profissional, seriedade, ética e honestidade como pessoa e médico. Obrigado por me apontar o caminho!

À minha mãe, por seu incondicional amor e dedicação. Obrigado por caminhar comigo, me ensinar a sonhar e a acreditar nos meus sonhos!

À minha irmã, **Rafaella**, pela amizade e apoio. Obrigado por dividir comigo as alegrias e responsabilidades familiares.

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Dr. Newton Kara José**, pelas sábias orientações e visionária liderança à frente do Departamento de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Obrigado por nos abrir as portas da Universidade de São Paulo e permitir nosso acesso à carreira universitária.

Ao **Professor Dr. Steven Eugene Wilson**, um admirável gênio da ciência. Obrigado por, durante três inesquecíveis anos, me ensinar a enxergar com os olhos de um cientista, por despertar em mim o prazer pela pesquisa, a sede pela busca de respostas e o constante senso crítico e imparcial. Obrigado também pelo exemplo de vida, senso de justiça e constante apoio e oportunidade aos que o cercam.

Ao **Professor Dr. Samir Jacob Bechara**, pelo apoio, incentivo e amizade na rotina e liderança do Serviço de Cirurgia Refrativa do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

Ao **Professor Dr. Milton Ruiz Alves**, pelo incondicional suporte e exemplo de dedicação à vida acadêmica.

À **Professora Dra. Ruth Santo**, pelas inúmeras e sinceras orientações, sugestões e revisão de vários projetos.

Ao grande amigo **Professor Dr. Renato Ambrósio Jr.**, pelo permanente apoio e inestimável amizade durante toda a fase de formação profissional. Uma grande fonte de inspiração pelo seu exemplo de dedicação e constante motivação no exercício profissional.

Aos coordenadores da pós-graduação, **Professor Dr. Carlos Alberto Rodrigues Alves**, por facilitar meu acesso à pós-graduação da USP, e **Professor Dr. Mario Luís Monteiro**, pela orientação e incentivo à pesquisa científica.

À **Srta. Regina Ferreira de Almeida**, por sua amizade e dedicação ao curso de pós-graduação.

Aos colegas e amigos do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo: **Dr. Fernando Betty Cresta, Dr. Jackson Barreto Jr., Dr. Renato Garcia, Dr. Alberto Cigna, Dr. Pedro Carricondo, Dr. Eduardo Martines, Dr. José Américo Bonatti, Dr. Marcelo Dal Coll, Dr. Emílio Moure, Dr. Ricardo Tokunaga, Dra. Cassiana Kannerberg, Dr. Francisco Crestana, e Srta. Adriana Mukai**, pelo apoio no desenvolvimento de novos projetos científicos.

Aos mestres que contribuíram para minha formação profissional: **Dr. Tadeu Cvintal, Dra. Fernanda Krieger, Dra. Aparecida Munarim, Dr. Durval de Carvalho Jr., Dr. Marcelo Ochiuto, Dr. Benicio Dini Mendonça, Dr. Wagner Guirelli e Dr. André Hamada**.

Aos meus colegas e importantes colaboradores da The Cleveland Clinic: **Dr. Rajiv Mohan, Dra. Sunilima Sinha, Dr. Ajay Sharma, Dr. William Dupps, Dra. Regina Chalita e Dr. Ronald Krueger**.

ÍNDICE

Resumo	viii
<i>Summary</i>	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	6
3 REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1 Fisiologia da resposta cicatricial	9
3.2 Eventos celulares componentes da resposta cicatricial corneana secundária à cirurgia refrativa a <i>laser</i>	10
3.2.1 Apoptose e necrose dos ceratócitos	11
3.2.2 Proliferação de ceratócitos	14
3.2.3 Formação de miofibroblastos	14
3.2.4 Retorno da córnea às suas funções fisiológicas	15
3.3 Resposta cicatricial corneana desencadeada pelo LASIK	17
3.4 Resposta cicatricial corneana desencadeada pelo PRK	20
3.5 Diferenças entre a resposta cicatricial corneana desencadeada pelo PRK e pelo LASIK	25
3.6 Perda da transparência corneana secundária ao PRK	28
3.7 Prevenção e tratamento da opacidade corneana secundária ao PRK	31
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	35
4.1 Tipo de estudo	36
4.2 População e amostra	36
4.3 Procedimentos e técnicas	39
4.4 Análise estatística	45
4.5 Aprovação do estudo	45
5 RESULTADOS	47
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÕES	64
8 REFERÊNCIAS	66
9 TABELAS	82
10 FIGURAS	85
11 ABREVIATURAS E SIGLAS	96
12 ANEXOS	99

RESUMO

Netto MV. *Efeitos do uso tópico da mitomicina C na prevenção e tratamento da opacidade corneana em coelhos submetidos à ceratectomia fotorrefrativa* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 101p.

Objetivos: Determinar os efeitos celulares e o mecanismo de ação da mitomicina C tópica na prevenção e tratamento da opacidade corneana em coelhos submetidos à ceratectomia fotorrefrativa (PRK). **Métodos:** Foram submetidos à cirurgia de PRK 224 coelhos para correção de -9 dioptrias esféricas, associada à aplicação de mitomicina C tópica ou solução salina balanceada. O nível de opacidade corneana foi avaliado por meio de análise à lâmpada de fenda. Os animais foram sacrificados quatro horas, 24 horas, quatro semanas e seis meses após a cirurgia. A análise imunohistoquímica foi realizada com as técnicas de TUNEL e foram utilizados os anticorpos Ki67 e alpha-SMA para a análise da apoptose celular, replicação celular e formação de miofibroblastos, respectivamente. **Resultados:** Todos os grupos submetidos à aplicação de mitomicina C apresentaram um maior número de células positivamente marcadas pelo ensaio com TUNEL (indicando maior taxa de apoptose celular) e um menor número de células positivamente marcadas pelo anticorpo Ki67 (indicando menor taxa de replicação celular). Uma menor quantidade de miofibroblastos (células positivamente marcadas pelo anticorpo alpha-SMA) foi identificada após a aplicação profilática da mitomicina C, comparada com sua aplicação com finalidade terapêutica. Além disso, identificou-se uma zona de acelularidade no estroma anterior de córneas tratadas com mitomicina C, persistente por um período mínimo de seis meses. **Conclusões:** A aplicação da mitomicina C diminuiu significativamente a formação de opacidade corneana em coelhos. Apesar da mitomicina C ter induzido uma maior apoptose de ceratócitos e miofibroblastos, seu principal mecanismo de ação, responsável pela prevenção da opacidade corneana, decorreu do bloqueio da replicação dos ceratócitos ou outras linhagens celulares progenitoras dos miofibroblastos. A aplicação da mitomicina C na concentração de 0,002% mostrou-se tão eficiente quanto sua aplicação na concentração de 0,02%. Não obstante, uma persistente diminuição da densidade de ceratócitos no estroma anterior pode representar um sinal de alerta para possíveis complicações a longo prazo.

Descritores: 1) mitomicina 2) PRK 3) LASIK 4) córnea 5) opacidade

SUMMARY

Netto MV. *Prophylactic and therapeutic effects of topical mitomycin C on corneal haze of rabbits submitted to photorefractive keratectomy* [thesis]. "São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 101p.

Purpose: To determine cellular effects and the mechanism through which topical mitomycin C prevents and treats corneal haze after photorefractive keratectomy (PRK) in rabbits. **Methods:** Minus nine diopters PRK with mitomycin C or balanced salt solution was performed in two hundred and twenty four New Zealand rabbits. Haze level was graded at the slit lamp. Rabbits were sacrificed at 4 hours, 24 hours, 4 weeks or 6 months after surgery and immunohistochemistry was performed with TUNEL assay, Ki67 and alpha-SMA to analyze keratocyte cells apoptosis, keratocyte cells replication and myofibroblast cells formation, respectively. **Results:** TUNEL-positive cells increased in all mitomycin C groups (representing more keratocyte cells undergoing apoptosis) while Ki67-positive cells decreased significantly (representing a decreased keratocyte cells replication) following mitomycin C application. A greater decrease in myofibroblasts was noted with prophylactic mitomycin C treatment than therapeutic mitomycin C treatment. There was, however, an anterior stromal acellular zone in eyes treated with mitomycin C that persisted out to the maximum follow-up of 6 months. **Conclusion:** Mitomycin C application significantly reduced corneal haze formation in rabbits. Its treatment induces apoptosis of keratocytes and myofibroblasts, but the predominate effect in inhibiting or treating haze appears to be at the level of blocked replication of keratocytes or other progenitor cells of myofibroblasts. Treatment with 0.002% mitomycin C appears to be just as effective as higher concentrations (0.02%) in the rabbit model. However, a persistent decrease in keratocyte cells density in the anterior stroma could be a warning sign for future complications.

Key words: 1) mitomycin 2) PRK 3) LASIK 4) cornea 5) haze

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a utilização do fluoreto de argônio (*Excimer Laser*) no comprimento de onda de 193 nm trouxeram grande contribuição para o aperfeiçoamento da cirurgia refrativa (Trokel *et al.*, 1983). O *Excimer laser* foi capaz de minimizar o dano térmico a regiões adjacentes ao local de sua aplicação e maximizar a acurácia e precisão da remoção tecidual. Sua rápida popularização, a partir da segunda metade da década de 80, aumentou significativamente a previsibilidade das cirurgias refrativas (Aron-Rosa *et al.*, 1985; Seiler *et al.*, 1986; McDonald *et al.*, 1987), bem como gerou um maior interesse por essa área da Oftalmologia. Estima-se que, atualmente, mais de vinte milhões de pessoas já foram submetidas a algum tipo de cirurgia com finalidade refrativa e espera-se que nos próximos dez anos, esse número ultrapasse os duzentos milhões (Fonte: *Market Scope* – 2005). A cirurgia refrativa é, hoje, o procedimento cirúrgico mais comum nos Estados Unidos (Fonte: *Newspaper Association of America* - 2005).

A técnica de fotoablação estromal com o *excimer laser*, subsequente à remoção epitelial, consiste numa das pioneiras e mais eficientes formas de correção cirúrgica das ametropias (Trokel *et al.*, 1983). Dentre as diversas técnicas de cirurgia refrativa, a ceratectomia fotorrefrativa por meio de *excimer laser* (PRK) é uma clássica e consagrada opção, caracterizada pelo

elevado grau de segurança, simplicidade técnica e eficácia na correção de baixos e moderados graus de miopia, astigmatismo e hipermetropia. Mesmo com a introdução de novas técnicas, como a ceratomileuse assistida por *excimer laser in situ* (LASIK), o PRK mantém-se como uma excelente alternativa. Além disso, o iminente risco de criação de uma lamela imperfeita, bem como, teoricamente, a maior alteração das propriedades biomecânicas da córnea após o LASIK, fazem do PRK a técnica cirúrgica de escolha em inúmeras situações (Netto *et al.*, 2005a).

Não obstante, a técnica PRK não é isenta de complicações, como a formação de opacidade corneana no pós-operatório, geralmente secundária à correção de altas ametropias (El-Maghraby *et al.*, 1999; Hersh *et al.*, 1997).

A transparência do tecido corneano depende de uma perfeita organização e distribuição das fibras de colágeno, bem como dos demais componentes celulares, representados pelas diferentes variações fenotípicas do ceratócitos. A cirurgia refrativa a *laser*, em especial a técnica PRK, desencadeia uma resposta cicatricial reparadora com a finalidade de restauração de suas propriedades anatômicas e funcionais. Além de alterações na densidade celular, ocorrem uma variável produção de componentes do tecido intersticial, bem como variações fenotípicas celulares que resultam na formação de miofibroblastos (Mohan *et al.*, 2003). O resultado final é a diminuição da transparência corneana, decorrente da formação de opacidade estromal que pode tornar-se clinicamente

significativa em alguns pacientes. Diversos fatores podem contribuir para a formação da opacidade corneana, inclusive a profundidade da ablação, a lentidão no processo de reepitelização e a irregularidade do leito estromal após a aplicação do *laser* (Moller-Pedersen *et al.*, 1998; Vinciguerra *et al.*, 1998; Netto *et al.*, 2006).

Com o objetivo de minimizar a formação da opacidade corneana pós-operatória, diversos moduladores da resposta cicatricial foram sugeridos como potenciais soluções (Kaji *et al.*, 2000; Lohmann *et al.*, 2003). Mais recentemente, sugeriu-se o uso tópico da mitomicina C no peroperatório da cirurgia de PRK para o tratamento e prevenção da opacidade corneana. Embora os resultados iniciais tenham demonstrado a eficácia da mitomicina C tópica no tratamento e na prevenção da formação de opacidades corneanas, estudos duplos-cegos e randomizados ainda se fazem necessários para a confirmação clínica de tais resultados preliminares. Espera-se que novos estudos demonstrem não só sua eficácia, mas principalmente sua segurança a longo prazo.

Além disso, ainda não foram avaliadas importantes questões envolvendo a dosagem ideal da mitomicina C a ser utilizada, nem o tempo de exposição ideal para a prevenção e o tratamento da opacidade corneana. Mesmo questões básicas, como o mecanismo primário de ação da mitomicina C na córnea, ainda não foram completamente elucidados.

Em resposta a essas questões, o presente estudo avalia o efeito de diferentes concentrações e tempos de exposição da mitomicina C tópica no

tecido corneano durante a cirurgia de PRK, com a finalidade de se prevenir e tratar a opacidade corneana.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são os abaixo apresentados.

- 1- Avaliar a eficácia da mitomicina C tópica, em diferentes concentrações e tempos de exposição, na prevenção e tratamento da opacidade corneana secundária à ceratectomia fotorrefrativa (PRK).
- 2- Avaliar a toxicidade estromal da mitomicina C tópica, quando aplicada em diferentes concentrações e tempos de exposição, na prevenção e tratamento da opacidade corneana secundária à ceratectomia fotorrefrativa (PRK).
- 3- Estudar o mecanismo de ação da mitomicina C na prevenção e tratamento de opacidades corneanas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FISILOGIA DA RESPOSTA CICATRICIAL CORNEANA

A resposta cicatricial desencadeada por procedimentos refrativos corneanos é um evento de extrema importância, pois representa um fator determinante para sua segurança e eficácia. O resultado refrativo final, bem como as diversas complicações potenciais, inclusive hipocorreção, hipercorreção, exacerbação de processos inflamatórios e formação de opacidades corneanas, estão diretamente relacionadas com o processo de cicatrização da córnea. Trata-se de um evento notavelmente complexo e que envolve inúmeras interações celulares. As células epiteliais, estromais e imunológicas, nervos corneanos e produtos das glândulas lacrimais participam diretamente desse processo (Wilson *et al.*, 2003b).

3.2 EVENTOS CELULARES COMPONENTES DA RESPOSTA CICATRICIAL CORNEANA SECUNDÁRIA À CIRURGIA REFRACTIVA A LASER

O processo cicatricial de reparação da córnea depois do trauma cirúrgico inicia-se imediatamente após a lesão epitelial, com a liberação de citocinas e fatores de crescimento (Wilson *et al.*, 1996; Mohan *et al.*, 1997; Helena MC *et al.*, 1998). Entende-se que as células epiteliais estejam em constante atividade metabólica e que os diversos fatores tróficos produzidos por elas sejam responsáveis pela ativação dos diferentes sistemas que interagem entre si com o objetivo de preservação das propriedades anatômicas e fisiológicas do tecido corneano. Portanto, a cicatrização corneana nada mais é do que uma resposta celular de defesa, que é comumente observada nos quadros de infecção e injúria mecânica. Seus principais objetivos são a restauração da estrutura tecidual e o restabelecimento de suas características anatômicas e funcionais.

A resposta biológica de cicatrização inicia-se imediatamente após o trauma cirúrgico epitelial, com a conseqüente liberação de diferentes citocinas, inclusive: interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (FNT-alfa), sistema ligante FAS, fator medular ósseo 2 e 4 (FMO-2 e 4), fator de crescimento epitelial (FCE), fator de crescimento plaquetário (FCP) entre outras collagenases e metaloproteinases (Wilson *et al.*, 1996 e 1999; Mohan *et al.*, 1997, 1998 e 2000; Tuominen *et al.*, 2001; Jester *et al.*, 2002). Dentre

elas, a interleucina-1 exerce papel fundamental e é considerada a principal mediadora das respostas celulares subseqüentes (Wilson *et al.*, 1996 e 1999). O FNT-alfa é produzido pelas células epiteliais e glândula lacrimal e também exerce importante função ao estimular os ceratócitos vizinhos à área acometida (Hong *et al.*, 2001). Todas essas citocinas e fatores de crescimento são encontrados em níveis basais nas células epiteliais, representando componentes indispensáveis na homeostase tissular corneana. Entretanto, sua liberação em quantidades excessivas depende de um estímulo traumático.

A lesão epitelial leva à quebra da barreira epitelial permitindo a ampla exposição das citocinas no tecido estromal, as quais acabam por se ligar a receptores específicos nos ceratócitos. Em consequência, fenômenos celulares importantes são desencadeados e resultam na apoptose e necrose dos ceratócitos, replicação dos fibroblastos, influxo de células inflamatórias e eventual formação de miofibroblastos.

3.2.1 Apoptose e necrose de ceratócitos

O desaparecimento de ceratócitos após lesão epitelial corneana foi evidenciado, inicialmente, por Dohlman e colaboradores em 1968 (Dohlman *et al.*, 1968). Estudos posteriores realizados em diferentes espécies animais confirmaram o desaparecimento dos ceratócitos, subseqüente à injúria epitelial (Campos *et al.*, 1994; Polack *et al.*, 1994; Alves *et al.*, 1996a). Em

1996, o mecanismo de desaparecimento dos ceratócitos foi estabelecido como sendo um fenômeno mediado pela apoptose celular (Wilson *et al.*, 1996).

A apoptose representa um mecanismo de morte celular programada que ocorre sem liberação significativa de enzimas lisossomais ou outros componentes celulares capazes de lesar tecidos vizinhos. O processo de apoptose pode ser detectado por microscopia eletrônica, bem como por técnicas de imunofluorescência (TUNEL-assay) (Wilson *et al.*, 1996; Helena *et al.*, 1998). A apoptose dos ceratócitos pode ser identificada imediatamente após o trauma epitelial e atinge um pico máximo quatro horas após a lesão, prolongando-se por vários dias depois do evento inicial (Wilson *et al.*, 1996; Helena *et al.*, 1998). A apoptose é caracterizada pela condensação cromatínica, degradação nuclear e eventual perda da membrana celular, resultando na liberação de corpúsculos apoptóticos (Gravieli *et al.*, 1992; Lovelace *et al.*, 1996).

O mecanismo exato pelo qual os ceratócitos sofrem apoptose permanece controverso. Citocinas provenientes de células epiteliais lesadas são consideradas o principal gatilho responsável pela iniciação da apoptose celular. Várias citocinas já foram identificadas por suas propriedades indutoras de apoptose, inclusive IL-1, FNT-alfa, FMO 2 e 4 e fator de crescimento com propriedades transformadoras (TGF) (Mohan *et al.*, 1998 e 2000; Wilson *et al.*, 1996 e 1999; Tuominen *et al.*, 2001; Jester *et al.*, 2002).

Mediadores inflamatórios produzidos no estroma corneano são também considerados extremamente importantes na regulação da cicatrização epitelial e atração de células inflamatórias, provenientes de vasos límbicos e produtos da secreção glandular (Mohan *et al.*, 2003; O'Brien *et al.*, 1998). Citocinas como a IL-1 e FNT-alfa, liberadas por células epiteliais lesadas ligam-se a receptores de ceratócitos e incitam a produção de fatores estimuladores de colônia de granulócitos e de fatores ativadores de monócitos. Através de imunofluorescência e microscopia eletrônica, identificam-se, dentre as várias células inflamatórias, principalmente macrófagos, monócitos, células T e polimorfonucleares (O'Brien *et al.*, 1998). Entre 12 e 24 horas após a lesão inicial, um elevado número de células de linhagem inflamatória migra para o estroma corneano onde permanecem por várias semanas (Mohan *et al.*, 2003). Em 2004, Wilson e colaboradores identificaram pela primeira vez, em modelos vivos de camundongos, o influxo de células derivadas da medula óssea para o estroma corneano, a partir de 12 horas após a abrasão epitelial. Os mesmos autores acreditam que essas células inflamatórias tenham importantes propriedades na reorganização estrutural pós-trauma, englobando corpúsculos celulares residuais e participando do processo de remodelação estromal.

Subseqüente ao processo de apoptose, um significativo número de células corneanas morre por processo de necrose. A necrose celular, por sua vez, é caracterizada pela perda da integridade da membrana plasmática, edema e lise celular, resultando na degradação do DNA nuclear e ulterior resposta inflamatória, a qual acomete as células vizinhas (Graf *et al.*, 1972).

O processo de necrose pode ser facilmente identificado por meio de análise ultra-estrutural, através de microscópio eletrônico.

3.2.2 Proliferação de fibroblastos

A proliferação dos ceratócitos remanescentes inicia-se entre 12 e 24 horas após a injúria epitelial. Intensas atividades mitóticas podem ser observadas nas áreas correspondentes ao *locus* deixado pelos ceratócitos que sofreram apoptose. Anticorpos específicos, marcadores da fase mitótica (fase G1-M), permitem a identificação e quantificação do processo proliferativo (Mohan *et al.*, 2003). Acredita-se que fatores de crescimento, como o FCP, sejam liberados do epitélio e sejam os responsáveis pela ativação e manutenção do processo de repovoamento estromal (Denk *et al.*, 1997). Os ceratócitos ativados, caracterizados por intensa atividade metabólica e proliferativa, são, provavelmente, os responsáveis pela transdiferenciação fenotípica dos ceratócitos, originando os chamados fibroblastos e miofibroblastos (Cintrón *et al.*, 1981).

3.2.3 Formação de miofibroblastos

Entre uma a duas semanas após a injúria corneana, é possível identificar inúmeros ceratócitos transdiferenciados em miofibroblastos (Mohan *et al.*, 2003). Os miofibroblastos representam uma variação

fenotípica dos ceratócitos, caracterizada por alto poder contrátil. Essas células são marcadas pela transparência alterada, secundária à produção desorganizada de proteínas cristalinas (Jester *et al.*, 1999). A transformação dos ceratócitos em miofibroblastos é ativada principalmente pela presença de fatores de crescimento, como o TGF-beta, e mediante a presença de uma diminuição da densidade celular (Jester *et al.*, 2002; Folger *et al.*, 2001). A identificação direta dos miofibroblastos é possível com o emprego de anticorpos específicos contra actina muscular lisa, tipo alfa. Os miofibroblastos são também responsáveis pela acentuada produção de colágeno, metaloproteinases, gelatinases, glicosaminoglicanas e fatores de crescimento hepatocíticos e ceratocíticos (Jester *et al.*, 1999 e 2002). A maior concentração dos miofibroblastos é identificada na junção epitélio-estromal e sua maior importância clínica está relacionada com a opacificação corneana pós-operatória (Mohan *et al.*, 2003). A modulação fenotípica dos ceratócitos, secundária ao trauma cirúrgico, resulta em alterações da fisiologia celular, inclusive a contratilidade exacerbada e a produção anômala de componentes da matriz extracelular (Dohlman *et al.*, 1968; Campos *et al.*, 1994).

3.2.4 Retorno da córnea às suas funções fisiológicas

A celularidade original e a função corneana tendem a retornar lentamente aos padrões de repouso. Atividades apoptóticas, necróticas e proliferativas diminuem notavelmente uma semana após a injúria inicial

(Mohan *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2003b). Depois, parte das células inflamatórias sofre apoptose ou necrose, enquanto outras podem, ocasionalmente, sofrer transdiferenciação celular. O tempo de restauração da anatomia e fisiologia corneana é variável e pode prolongar-se por meses ou anos. Por exemplo, nos casos mais intensos, que resultam na acentuada irregularidade e perda da estrutura anatômica corneana, poderá ocorrer uma formação numerosa de miofibroblastos. Nesses casos, é esperada uma perda significativa da transparência corneana que pode até permanecer de modo indefinido. Entretanto, a tendência é sua gradativa reorganização estrutural e fisiológica, com lenta recuperação de sua transparência (Wilson *et al.*, 2003b).

A intensidade da resposta celular é variável, dependendo das características genéticas individuais (como, por exemplo, o grau de resistência tecidual às diferentes concentrações de fatores tróficos) e de fatores relacionados com o trauma ou com a técnica cirúrgica empregada (como localização, profundidade, extensão e regularidade da injúria epitélio-estromal) (Wilson *et al.*, 2003a, Netto *et al.*, 2005b, 2006).

3.3 RESPOSTA CICATRICIAL CORNEANA DESENCADEADA PELO LASIK

O ceratomileuse assistido por *excimer laser in situ* (LASIK) envolve a criação de um retalho lamelar estromal previamente à fotoablação, permitindo que, subseqüentemente, ele seja reposicionado. A integridade epitelial na região central da córnea e, em particular, a preservação da membrana basal resultam em uma resposta cicatricial mais branda. Clinicamente, observa-se uma recuperação mais rápida da visão, com um mínimo de desconforto pós-operatório e maior reprodutibilidade do efeito refrativo.

No plano celular, observa-se trauma epitelial mínimo, correspondente à área de penetração do microcerátomo na periferia da córnea. A criação do retalho corneano resulta em uma cicatrização fibrótica localizada exclusivamente na periferia e corresponde à borda do retalho lamelar em que houve a lesão epitelial acompanhada da ruptura da membrana basal (Ivarsen *et al.*, 2003). Após o LASIK, a resposta cicatricial é geralmente mais branda, envolvendo menor ativação celular. Histologicamente, observa-se menor hiperplasia epitelial e menor remodelação estromal. Como principal característica, evidencia-se uma diferenciação mínima de ceratócitos em miofibroblastos, responsáveis pela reação fibrótica e conseqüente opacidade corneana pós-operatória. Entretanto, a resposta cicatricial secundária ao LASIK varia de acordo com as características individuais e com fatores intra-

operatórios, como a profundidade e a regularidade do leito estromal submetido à fotoablação (Moller-Pedersen *et al.*, 1998; Vinciguerra *et al.*, 1998). Clinicamente, observa-se menor regressão do efeito refrativo, com rápido restabelecimento da acuidade visual.

A preservação da integridade epitelial na região central da córnea resulta em menor interação entre células epiteliais e estromais, levando a menor ativação de ceratócitos e menor índice de apoptose e necrose celulares (Mohan *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2003a). Em paralelo, a integridade da membrana basal exerce, teoricamente, uma função de barreira mecânica, protegendo o leito estromal da ação de fatores pró-inflamatórios, provenientes de células epiteliais e, em menor proporção, de células glandulares (Stramer *et al.*, 2003). Essa soma de fatores é responsável pela ausência de opacificação pós-operatória na região central da córnea.

De modo geral, esse é o comportamento cicatricial pós-operatório padrão após o LASIK; mas, obviamente, podem ocorrer significativas alterações fisiológicas mediante complicações per ou pós-operatórias (Netto *et al.*, 2005b). A presença de dano epitelial peroperatório, por exemplo, pode prolongar a ativação celular e a resposta inflamatória, acarretando exagerada quimiotaxia e, conseqüentemente, maior afluxo de células inflamatórias, podendo resultar em quadro de ceratite lamelar difusa (Mulhem *et al.*, 2002; Holzer *et al.*, 2003). A descarga de citocinas será proporcional ao dano causado às células epiteliais. Dentre as diversas

citocinas liberadas pelas células epiteliais lesadas, o fator de crescimento epitelial tem grande importância. Tal fator tem atuação direta na remodelação epitelial pós-operatória, participando ativamente dos mecanismos de adesão e proliferação das células epiteliais (Nakamura *et al.*, 2001).

Dentre as complicações peroperatórias, temos a criação do retalho lamelar imperfeito - como o retalho perfurado (*button-hole flaps*) ou o retalho lamelar muito fino - que poderá resultar na reação cicatricial fibrótica, com alta concentração de miofibroblastos e, conseqüentemente, opacificação corneana (Netto *et al.*, 2005c). Também como parte de um processo cicatricial atípico, merece destaque a presença de células epiteliais na interface entre o retalho lamelar e o estroma. Células epiteliais acumuladas no leito estromal mantêm atividade metabólica, produzindo citocinas e fatores de crescimento capazes de afetar a remodelação estromal e atrair células inflamatórias, podendo provocar quadro inflamatório difuso (Wilson *et al.*, 2003b). Da mesma forma, mediante a presença de processo infeccioso, poderá haver intensa ativação inflamatória com elevado grau de necrose celular, bem como intensa atividade colagenolítica (Natarajan *et al.*, 2002). A presença de tais fatores complicadores pode levar a resultados anatômico-funcionais completamente imprevisíveis. Além disso, a possibilidade de ectasias iatrogênicas representa uma importante limitação à técnica LASIK, especialmente em pacientes com espessura corneana diminuída e alteração da curvatura corneana.

3.4 RESPOSTA CICATRICIAL CORNEANA DESENCADEADA PELO PRK

A ceratectomia fotorrefrativa por *excimer laser* (PRK) consiste na remoção mecânica da camada epitelial corneana, incluindo sua membrana basal, com subsequente fotoablação da membrana de Bowman e porção anterior do estroma corneano. A remoção mecânica da membrana basal epitelial, bem como a fotoablação da membrana de Bowman, resultam na completa exposição do leito estromal às citocinas e fatores de crescimento liberados pelas células epiteliais lesadas e pelas citocinas presentes no filme lacrimal.

A resposta cicatricial observada após o PRK é um fenômeno geralmente intenso, resultando muitas vezes em hiper ou hipocorreção, regressão do efeito refrativo e, principalmente, opacificação corneana após a correção de altas ametropias. A intensidade da resposta cicatricial pós-PRK tem relação direta com a quantidade de tecido estromal fotoablado. A distribuição heterogênea dos ceratócitos, com maior concentração no estroma anterior, pode justificar as diferenças na intensidade da resposta cicatricial após a correção de diferentes níveis de ametropia (Patel *et al.*, 1999). Os eventos celulares são geralmente mais marcantes após o PRK, acarretando maior hiperplasia epitelial e remodelação estromal pós-operatória. Além disso, quanto maior o erro refrativo a ser corrigido, maior a

chance de imprevisibilidade refracional pós-operatória e maiores as possibilidades de opacificação corneana.

A maior extensão epitelial submetida à lesão cirúrgica leva à maior liberação de fatores pró-inflamatórios epiteliais, principalmente IL-1, FNT-alfa, sistema ligante FAS, FMO-2 e 4, FCE, FCP e TGF (Wilson *et al.*, 1996 e 1999; Mohan *et al.*, 1998 e 2000; Tuominen *et al.*, 2001; Jester *et al.*, 2002). Mediante dano à membrana basal epitelial, fatores de crescimento do epitélio estimulam a produção de fibronectina para cobrir a área defeituosa, que servirá como uma matriz temporária para a adesão das células epiteliais (Phan *et al.*, 1989). Além disso, outras citocinas, integrinas, lamininas e fibronectinas influenciam no mecanismo de adesão das células epiteliais (Kurpakus *et al.*, 1999). Essas citocinas também atuam no leito estromal exposto induzindo a apoptose celular. Conseqüentemente, observam-se intensa ativação celular, com alta taxa de apoptose e necrose de ceratócitos, bem como proliferação de fibroblastos e diferenciação de miofibroblastos (Mohan *et al.*, 1998).

Por outro lado, observa-se uma alta produção de fibras colágenas desorganizadas e de outros materiais celulares, resultando em diferentes níveis de opacidade corneana. A diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos pode ser bastante significativa após o PRK, principalmente após a correção de elevadas ametropias (Mohan *et al.*, 2003). Os miofibroblastos representam uma variação fenotípica dos ceratócitos, caracterizados por alto poder contrátil e maior bloqueio à passagem da luz

(Jester *et al.*, 1994, 2003). Apesar de contribuírem para o fechamento da ferida cicatricial, os miofibroblastos provocam contratura e escarificação tecidual. Estudos *in situ* e *in vitro* identificaram a participação direta de TGF-beta na diferenciação dos miofibroblastos (Jester *et al.*, 2002; Folger *et al.*, 2003). Acredita-se, também, que a expressão de TGF-beta esteja significativamente elevada durante a reconstrução epitelial. Por isso, as chances de opacificação corneana são maiores em casos de retardo do processo de epitelização, quando o leito estromal sofre prolongada exposição à ação de TGF-beta. Estudos experimentais utilizando bloqueadores de TGF-beta mostraram significativa redução na formação de opacidade estromal pós-operatória (Thom *et al.*, 1997).

De modo geral, a resposta cicatricial pós-PRK é caracterizada por maior hiperplasia epitelial e remodelação estromal (Netto *et al.*, 2005b). A hiperplasia epitelial decorre da tentativa de se restaurar a conformação original da córnea e de se reestabelecer a regularidade de sua superfície. A remodelação estromal resulta da renovação de ceratócitos e da conseqüente produção e reorganização da matriz extracelular.

A uniformidade do diâmetro e distribuição das fibras de colágeno no espaço intersticial resultam em máxima translucidez da córnea (Maurice *et al.*, 1970). Além disso, a distribuição balanceada de macromoléculas intersticiais, como proteoglicanas e glicosaminoglicanas, tem acentuada importância na manutenção das propriedades ópticas e fisiológicas do tecido corneano (Michelacci *et al.*, 2003). O traumatismo cirúrgico representado

pelo PRK leva à profunda desorganização anatômica. Além da agressão celular e alterações anatômicas, são quebradas importantes barreiras fisiológicas corneanas, produzindo a ativação de diferentes mecanismos de reparo celular. Eventualmente, ocorre a formação de miofibroblastos que respondem por meio da produção desorganizada de componentes extracelulares, resultando, clinicamente, em diferentes graus de opacidade corneana.

A formação da opacidade corneana é mais comum após o PRK e está diretamente relacionada com a quantidade e profundidade de tecido estromal fotoablado. Outros fatores, como a regularidade final do leito estromal ablado e o tempo de fechamento do defeito epitelial, podem também repercutir no grau de opacificação corneana. Estudos experimentais têm demonstrado um pico de formação de miofibroblastos em torno de quatro semanas após a cirurgia, o que coincide com o aparecimento da opacidade corneana pós-operatória (Mohan *et al.*, 2003). Por outro lado, a precisa localização subepitelial dos miofibroblastos coincide com a identificação clínica da área de opacidade corneana.

Na maioria das vezes, o grau de opacificação corneana tende a diminuir com o passar do tempo. Geralmente, num período de 12 meses, observa-se significativa melhora no nível de opacidade corneana, embora, em muitos casos, não ocorra seu total desaparecimento. O desaparecimento de miofibroblastos também é coincidente com a melhora da opacidade corneana. Acredita-se que muitas dessas células desapareçam por processo

de apoptose ou necrose celular. Entretanto, Maltseva e colaboradores, em 2001, demonstraram a reversibilidade fenotípica dos ceratócitos, provando não ser os miofibroblastos uma diferenciação terminal. Segundo esses autores, a exposição de miofibroblastos a FGF-1 ou FGF-2 e heparina levam à sua conversão fenotípica em fibroblastos (Maltseva *et al.*, 2001).

Obviamente, a resposta cicatricial pós-PRK depende também de várias características individuais, inclusive de fatores genéticos, diferentes graus de sensibilidade estromal às citocinas e fatores de crescimento. Além disso, variações técnicas e distintas quantidades de tecido ablado e diferentes níveis de irregularidades superficial repercutirão diretamente na intensidade da resposta pós-operatória.

3.5 DIFERENÇAS ENTRE A RESPOSTA CICATRICIAL CORNEANA APÓS PRK E LASIK

O PRK e o LASIK representam os procedimentos refrativos realizados com maior frequência. Entretanto, diferenças no processo cicatricial pós-operatório repercutirão em vantagens e desvantagens clínicas significativas. Do ponto de vista clínico, o menor desconforto pós-operatório, bem como uma rápida reabilitação visual e maior previsibilidade quanto aos resultados, representam as vantagens de um processo cicatricial mais brando, evidenciado após o LASIK. Tais características ilustram as principais vantagens clínicas do LASIK sobre o PRK.

Inúmeros estudos sobre o processo de cicatrização envolvendo ambas as técnicas foram desenvolvidos em diferentes espécies, baseados em modelos experimentais (Wachtlin *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2003). Vários desses estudos contribuíram de forma importante para um maior entendimento das interações celulares secundárias ao trauma cirúrgico corneano.

Mohan e colaboradores, em 2003, desenvolveram um estudo detalhado da resposta cicatricial em coelhos submetidos a PRK e a LASIK. Esse estudo analisou diferenças quantitativas e qualitativas na resposta cicatricial secundária a ambos procedimentos. Um total de 144 coelhos foram distribuídos em três grupos: PRK para correção de baixa miopia (-4.5

dioptrias), PRK para correção de alta miopia (-9.0 dioptrias) e LASIK para correção de alta miopia (-9.0 dioptrias). Os animais dos três subgrupos foram sacrificados, respectivamente, em quatro, 24 e 72 horas, quatro semanas e três meses após o procedimento inicial, incluindo oito animais em cada subgrupo. Foram quantificados o grau de apoptose e necrose celular, proliferação de fibroblastos, diferenciação de miofibroblastos e influxo de células inflamatórias. O mesmo estudo identificou níveis significativamente mais elevados de apoptose, proliferação de fibroblastos e diferenciação de miofibroblastos após PRK para correção de alta miopia, em comparação com o LASIK e PRK para correção de baixa miopia. Além disso, constatou-se significativa diferença no padrão de resposta entre PRK e LASIK. Após o LASIK, identificou-se uma resposta celular em plano mais profundo do estroma corneano, correspondendo à região localizada abaixo do retalho lamelar. Por outro lado, após o PRK foi observada uma intensa atividade celular nas camadas mais superficiais do estroma corneano. Contrariamente ao PRK, não se identificaram miofibroblastos no estroma corneano de animais submetidos à técnica LASIK, o que, clinicamente, se correlaciona com a ausência de opacificação estromal pós-LASIK.

Tais observações levam a crer que a maior integridade epitelial central, associada à preservação da membrana basal epitelial verificada após o LASIK, possa ser responsabilizada por tais diferenças. Entretanto, permanece intrigante e obscuro o motivo pelo qual se observam abundantes miofibroblastos após o PRK para correção de alta miopia, contrariamente ao que ocorre após o PRK para correção de baixa miopia. Essas diferenças

apontam, ainda, para a participação de múltiplos mecanismos, como a quantidade e a profundidade de tecido estromal ablado, bem como a regularidade final do leito ablado. Acredita-se que, quanto maior a ablação estromal, maior seja a indução de irregularidades e aberrações superficiais, resultando na opacificação corneana.

3.6 PERDA DA TRANSPARÊNCIA CORNEANA SECUNDÁRIA AO PRK

O tecido corneano é caracterizado por uma perfeita organização de suas estruturas com o objetivo de se manter a preservação de sua transparência, que é fundamental para o exercício das funções visuais (Maurice *et al.*, 1970; Boote *et al.*, 2003). As fibras de colágeno constituintes do estroma da córnea se encontram perfeitamente alinhadas e envoltas por proteoglicanas (Michelacci *et al.*, 2003). A produção de todos esses componentes estromais é determinada pelas células corneanas, chamadas ceratócitos, que são responsáveis pela função de homeostase da córnea (Jester *et al.*, 1994). Os ceratócitos são células não contráteis, especializadas na produção de componentes intersticiais (Jester *et al.*, 2003).

Alterações nas condições fisiológicas da córnea, determinadas pela lesão traumática, infecciosa ou cirúrgica, acionam um mecanismo de defesa local envolvendo intensa participação celular com o objetivo de contenção do dano tissular, com posterior reconstrução anatômica e funcional. Esse processo cicatricial corneano envolve diretamente os ceratócitos, que podem distinguir-se fenotipicamente e ocasionar a produção de diferentes componentes estromais que, muitas vezes, culminam com a perda de sua transparência (Jester *et al.*, 2003; Soriano *et al.*, 2001).

O traumatismo corneano ocasionado pelas várias técnicas de cirurgia refrativa a *laser* envolve também uma intensa resposta cicatricial e pode, potencialmente, provocar a perda de sua transparência. Dentre as diversas técnicas de cirurgia refrativa, o PRK é uma opção clássica e consagrada pelo tempo, caracterizada por um elevado grau de segurança, simplicidade técnica e eficácia na correção de baixos e moderados graus de miopia, astigmatismo e hipermetropia. Mesmo com a recente introdução de novas técnicas, como o LASIK, o PRK sempre se manteve como uma excelente alternativa cirúrgica. Além disso, o eminente risco de desestabilização biomecânica da córnea, através da possível indução de ectasia corneana secundária ao LASIK, faz do PRK a técnica cirúrgica de escolha em inúmeras situações (Netto *et al.*, 2005a, 2004).

No entanto, a técnica PRK apresenta, igualmente, algumas possíveis complicações pós-operatórias, dentre as quais se destaca o alto risco de opacificação corneana secundária à correção de elevados erros refracionais. Após o PRK, a conformação natural da matriz extracelular da córnea é alterada, implicando mudanças na densidade celular e principalmente na fenotipagem celular. Tais modificações associam-se ao aparecimento de miofibroblastos e à produção desorganizada de componentes intersticiais que levam, em última instância, à perda da transparência corneana. Diferentes fatores de risco para a opacificação corneana são sugeridos, como a elevada quantidade de tecido removido pelo *laser*, a reepitelização tardia e a regularidade do leito estromal residual. Netto e colaboradores confirmaram, em 2006, a importância direta da regularidade do leito estromal

após o PRK no desenvolvimento da opacidade corneana. Entretanto, sugere-se que uma associação de diferentes fatores seria mais importante do que a presença de fatores de risco isolados. Com o objetivo de minimizar o risco de opacificação corneana pós-PRK, diferentes fármacos e moduladores da resposta cicatricial têm sido propostos, infelizmente sem maior sucesso. Dentre eles, o uso tópico da mitomicina C, durante a cirurgia de PRK, foi sugerido recentemente com o objetivo de tratar e prevenir a formação da opacidade corneana (Majmudar *et al.*, 2000).

3.7 PREVENÇÃO E TRATAMENTO DA OPACIDADE CORNEANA SECUNDÁRIA AO PRK

As mitomicinas são potentes antibióticos que pertencem à família das quinolonas antitumorais (Galm *et al.*, 2005). Em 1956, as mitomicinas A e B foram isoladas do extrato de *Streptomyces caespitosus* e, logo a seguir, também se descobriu e se isolou a mitomicina C (Galm *et al.*, 2005). A mitomicina C é capaz de formar uma ligação co-valente com o ácido desoxiribonucleico (DNA) e inibir sua síntese, funcionando como um potente quelante celular (Fujita *et al.*, 1997; Galm *et al.*, 2005). Em altas concentrações de MMC, o ácido ribonucleico (RNA) e toda a síntese proteica podem ser suprimidos (Galm *et al.*, 2005; Fujita *et al.*, 1997). Em consequência desse efeito ciclostático, a MMC é, teoricamente, capaz de inibir a mitose celular e também a proliferação das células epiteliais, estromais e endoteliais do tecido corneano (Jampel *et al.*, 1992; Nuvts *et al.*, 1992; Kang *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999).

O potente efeito da MMC na inibição da replicação celular despertou o interesse para sua possível utilização como uma substância moduladora da resposta cicatricial corneana e conjuntival. Watanabe e colaboradores, em 1997, demonstraram, experimentalmente, que a atividade replicadora das células conjuntivais foi reduzida de modo extraordinário mediante a aplicação tópica da MMC. A observação de tal efeito veio demonstrar sua possível eficácia nas cirurgias filtrantes para o tratamento do glaucoma.

Recentemente, sugeriu-se sua potencial eficácia na inibição da proliferação de células neoplásicas no tecido conjuntival (Tseng *et al.*, 1997).

Talamo e colaboradores, em 1991, propuseram, pela primeira vez, a utilização da MMC como um modulador da resposta cicatricial após o PRK. Tal estudo mostrou uma menor formação de tecido colágeno nos coelhos tratados com MMC após o PRK, associado a um menor grau de opacidade corneana. No entanto, o primeiro relato de utilização da MMC na córnea humana foi feito por Majmudar e colaboradores, em 2000, com o objetivo de tratar pacientes com significativa fibrose subepitelial secundária a procedimentos refrativos. Os autores relataram melhora importante no grau de transparência da córnea após uma única aplicação peroperatória de MMC a 0,02% durante dois minutos. Além disso, Carones e colaboradores, em 2002, relataram importante redução no nível de opacificação corneana em pacientes submetidos ao PRK, associada ao uso profilático da MMC 0,02%, quando comparado com o grupo de controle. Contudo, sérias complicações tardias, como afinamento e perfuração escleral, já foram previamente relatadas, secundárias ao uso subconjuntival ou tópico de mitomicina C, em altas concentrações ou após repetidas aplicações (Dougherty *et al.*, 1996). Em 2004, Pfister relatou um caso de edema permanente de córnea após tratamento com ceratectomia fototerapêutica associada a uso tópico, em múltiplas dosagens, de MMC. Em um estudo experimental com coelhos, Chang, em 2004, também evidenciou alterações morfológicas nas células endoteliais e uma significativa taxa de morte celular por apoptose, caracterizando uma possível toxicidade endotelial. Alves e

colaboradores, em 1996, evidenciou retardo na epitelização, homogenização das fibras colágenas, edema estromal e possível infiltração inflamatória de linfócitos polimorfonucleares quando a mitomicina foi repetidamente aplicada no epitélio corneano de coelhos, na concentração de 0.4mg/ml. Recentemente, Morales e colaboradores realçaram uma importante diminuição da contagem de células endoteliais após aplicação de MMC, durante cirurgia de PRK em 18 olhos (Morales *et al.*, 2006). Por outro lado, Lee e colaboradores não apontaram perda endotelial após aplicação de MMC durante a cirurgia de PRK em 1011 olhos (Lee *et al.*, 2005). Até o presente momento, não existem relatos de maiores complicações relacionadas com o uso peroperatório da MMC tópica durante a cirurgia de PRK.

Apesar dos bons resultados iniciais com uso da MMC no tecido corneano, várias questões permanecem sem resposta envolvendo, principalmente, sua real eficácia para prevenir e tratar a opacidade corneana, bem como seu possível efeito tóxico. Até agora, todos os estudos avaliando a eficácia da MMC para reduzir a opacidade corneana foram baseados em variáveis subjetivas, inclusive a graduação da opacidade com o emprego da lâmpada de fenda ou microscopia confocal. A caracterização dos miofibroblastos como células diretamente responsáveis pela opacidade da córnea, permite, atualmente, uma avaliação pós-*morten* objetiva e quantitativa do grau de opacidade pós-operatória. No presente estudo, utilizamos anticorpos específicos contra proteínas típicas dos

miofibroblastos, como a actina muscular lisa alfa, para permitir a quantificação direta da opacidade estromal em uma área específica.

Nenhum estudo, até o momento, havia descrito o mecanismo de ação da MMC no tecido corneano. Por outro lado, diferentes concentrações de mitomicina C ainda não haviam sido estudadas quanto à eficácia e à segurança em se prevenir e tratar opacidades corneanas após procedimentos fotorrefrativos.

O presente estudo faz uma análise da ação da mitomicina C, aplicada de forma tópica, em olhos de coelhos submetidos à cirurgia de PRK para correção de elevados graus de miopia. Neste estudo, fazemos uma avaliação objetiva da eficácia da mitomicina C na prevenção e tratamento de opacidades corneanas, bem como uma pesquisa de seus potenciais efeitos tóxicos a curto e médio prazos (seis meses).

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Desenvolveu-se estudo experimental prospectivo e randomizado em modelo animal, com intervenções realizadas no Centro de Pesquisa em Animais da *The Cleveland Clinic Foundation (Lerner Research Building)* em Cleveland, Ohio (E.U.A). Os animais foram tratados de acordo com as determinações preconizadas pela ARVO, referentes ao uso de animais de experimentação nas pesquisas oftalmológicas.

Os exames laboratoriais foram realizados no laboratório de pesquisas de córnea da *The Cleveland Clinic Foundation (Cole Eye Institute)* em Cleveland, Ohio (E.U.A.)

4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Foram incluídos no estudo 224 coelhos, fêmeas, da raça neozolandesa. Os coelhos tinham entre 12 e 15 semanas de idade e

apresentavam peso entre 2,5 e 3 kg. Apenas um olho de cada coelho foi selecionado aleatoriamente para fazer parte do estudo. Inicialmente, os animais foram distribuídos em dois grupos (profilático e terapêutico) e, depois, subdivididos, formando um total de nove grupos (tabela 1).

Para estudar a prevenção da opacidade (Grupos Profiláticos), a mitomicina C foi aplicada imediatamente após a fotoablação do *laser* no estroma corneano e comparada com o grupo de controle, o qual recebeu a aplicação de solução salina balanceada após a fotoablação corneana. Os grupos profiláticos foram: (tabela 1)

- P-I: mitomicina C na concentração de 0.02% por dois minutos,
- P-II: mitomicina C na concentração de 0.02% por um minuto,
- P-III: mitomicina C na concentração de 0.02% por 12 segundos,
- P-IV: mitomicina C na concentração de 0.002% por dois minutos,
- P-V: mitomicina C na concentração de 0.002% por um minuto,
- P-VI: mitomicina C na concentração de 0.002% por 12 segundos,
- C: solução salina balanceada.

Para estudar a ação da mitomicina C no tratamento da opacidade corneana (Grupos Terapêuticos), realizou-se previamente o PRK para a correção de -9.0 dioptrias, com o objetivo de se induzir opacidade corneana. Quatro semanas após o PRK, procedeu-se à remoção mecânica do epitélio

corneano e a mitomicina C foi, subsequente, aplicada no leito estromal com opacidade (grupo T-1). Quando aplicada com objetivo terapêutico, a concentração da mitomicina foi de 0.02% por dois minutos. O respectivo grupo de controle (grupo T-2) também foi submetido ao PRK para a correção de -9.0 dioptrias e, quatro semanas depois, foi realizada a desepitelização corneana e aplicada solução salina balanceada ao invés de mitomicina C.

Todos os olhos foram submetidos à correção cirúrgica de -9.0 dioptrias pela técnica PRK, com uma zona óptica de 6,0 mm, com o *Excimer Laser Apex Plus Summit Laser* (Alcon, Forth Worth, Texas, E.U.A.). Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo cirurgião (MVN). Foram ablatadas 108 µm (421 pulsos) de tecido corneano pela técnica PRK.

Foram estabelecidos três pontos específicos para a análise dos grupos profilático e terapêutico: quatro horas, 24 horas e quatro semanas após a cirurgia. Foram incluídos seis animais em cada período de análise. Para a análise de efeitos a médio prazo, incluiu-se um quarto ponto de análise no grupo profilático 1 (P-1) e no grupo de controle (C). O ponto das quatro horas foi selecionado para a análise do pico de apoptose celular. O ponto de análise das 24 horas foi selecionado para a análise do pico de proliferação dos fibroblastos. O das quatro semanas foi estabelecido para a análise do pico de formação dos miofibroblastos. Finalmente, o ponto de análise dos seis meses foi selecionado para o estudo da densidade dos ceratócitos a médio prazo.

Animais que desenvolveram algum infiltrado corneano sugestivo de processo infeccioso ou apresentaram defeito epitelial persistente (por período superior a uma semana) foram excluídos do estudo e substituídos por outros.

4.3 PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS

4.3.1 Anestesia, sedação e eutanásia

A anestesia foi obtida através da injeção intramuscular de hidrocloreto de cetamina (30 mg/kg) e hidrocloreto de xilazina (5 mg/kg). Além disso, aplicou-se anestesia tópica com hidrocloreto de proparacaína a 1% em ambos os olhos, imediatamente antes do início do procedimento.

O sacrifício dos animais foi realizado com injeção intravenosa de fentobarbital (100 mg/kg) após prévia sedação intramuscular.

4.3.2 PRK com aplicação de mitomicina ou solução salina balanceada

Sob anestesia geral e tópica, inseriu-se um blefarostato para o afastamento palpebral. Em seguida, um diâmetro de 6 mm da região central do epitélio corneano foi removido com um bisturi lâmina número 64 ((Beaver; Becton-Dickinson), com a lâmina posicionada a 45° da superfície. A seguir,

realizou-se a aplicação do *excimer laser* para a correção de -9.0 dioptrias com o *Laser Summit Apex Plus* (Alcon, Fort Worth, DL). Imediatamente após o *laser*, foi realizada a aplicação de uma esponja de merocel embebida com solução salina balanceada ou MMC. Subseqüentemente, procedeu-se à irrigação do estroma corneano com 30 ml de solução fisiológica. Depois, foram aplicadas duas gotas de hidrocloreto de ciprofloxacina a 0,3% (Ciloxan®, Alcon, Fort Worth, TX) no olho operado.

Nos grupos de tratamento de opacidades corneanas (T-I e T-II), utilizou-se um bisturi lâmina número 64 com o objetivo de remover o epitélio e a fibrose subepitelial. A seguir, fez-se a aplicação da mitomicina C ou solução salina balanceada nos grupos T-I e T-II, respectivamente.

4.3.3 Retirada do botão córneo-escleral, formação dos blocos de tecidos e confecção das lâminas

Após o sacrifício dos coelhos, os botões córneo-esclerais foram retirados com pinça 0,12 e tesouras de Westcott. Para a análise histológica, as córneas foram depositadas em um recipiente contendo OCT líquido (*Sakura FineTek*, Torrance, CA, USA) para criopreservação a seco (sem fixação prévia). O recipiente (molde de 24 mm x 24 mm x 5 mm) contendo o tecido corneano foi rapidamente congelado após a exposição a 2-metil butano e nitrogênio líquido. Os blocos congelados foram preservados em *freezer* de -80⁰ C (*Sevener*, Houston, TX), durante dois meses, até o

momento da confecção das lâminas. Os blocos congelados foram datados e identificados em sua face posterior.

As secções de 7 µm de espessura foram feitas utilizando um criostato (HM 505M, *Micron GmbH*, Walldorf, Alemanha). As secções foram colocadas em lâminas de vidro e armazenadas em *freezer* de -85⁰ C.

4.3.4 Estudo histológico, ensaio de TUNEL e estudos imuno-histoquímicos

Estudo histológico

Os blocos contendo o espécime foram retirados do *freezer* e deixados por dez minutos no aparelho criostato (HM 505M, *Mícron GmbH*), que apresentava temperatura de -20°C. Em seguida, os blocos foram colocados no suporte metálico para o corte das secções. O composto OCT Líquido foi utilizado para fixação do bloco no suporte. Sob a temperatura de -20°C, o OCT líquido levava cerca de cinco minutos para se solidificar e se tornar branco, mostrando que o bloco estava adequadamente fixado ao suporte. Esse conjunto foi colocado em posição para a realização do corte. Utilizou-se uma nova lâmina de corte para cada bloco. Secções corneanas de 7 µm de espessura foram obtidas partindo-se do centro da córnea e colocadas em lâminas de vidro de 25 mm x 75 mm x 1 mm (Superfrost Plus). Cada lâmina foi montada com três secções, dispostas paralelamente. As lâminas foram observadas com o auxílio do microscópio óptico para assegurar a

integridade e a regularidade dos cortes, sendo, depois, armazenadas em uma caixa própria. Em seguida, foram novamente colocadas no *freezer* a -85°C até o momento do processamento (Wilson *et al.*, 2003a,b; Mohan *et al.*, 2003). Para o estudo histológico, os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina e contracorados com azul de Richardson.

Ensaio de TUNEL

Utilizou-se o ensaio histoquímico TUNEL para detectar a fragmentação do DNA, associada com o processo de morte celular programada (apoptose). As lâminas contendo os cortes histológicos de $7\mu\text{m}$ de espessura foram retiradas do *freezer* e fixadas em acetona por dois minutos. Em seguida, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por cinco minutos e colocadas em frasco contendo solução salina balanceada. Na seqüência, foi realizado o ensaio TUNEL fluorescente de acordo com a técnica descrita por Mohan *et al.* (1997, 2000, 2003) e segundo instruções comerciais contidas nos protocolos ApopTag, S7165 (*Intergen*). Lâminas contendo os controles sabidamente positivos e negativos foram incluídas rotineiramente nas análises. Para controle positivo, utilizaram-se cortes de córnea de coelho submetido a PRK para alta miopia (-9.00 D), quatro horas antes do sacrifício, conforme descrito por Mohan *et al.* (2003). Para o controle negativo, utilizaram-se cortes de córnea de coelhos que não sofreram nenhum tipo de cirurgia. As lâminas foram analisadas com o auxílio do microscópio fluorescente modelo E600 (*Nikon*).

Outros estudos Imuno-histoquímicos

Para a realização das técnicas de imunofluorescência para identificação de Ki67 e SMA, os estudos foram feitos conforme técnica previamente descrita e publicada por Zieske em 1993. Um dos anticorpos utilizados foi o anti-Ki67 (*Zymed, South San Francisco, CA, USA*), que é capaz de identificar as células com alta atividade proliferativa (localizadas na fase G1-M da mitose celular). O anticorpo anti-Ki67 do laboratório Zymed foi utilizado na concentração de 214,6 mg/L, com o período de incubação de duas horas em temperatura ambiente.

Outro anticorpo utilizado foi o anti-SMA (*DAKO; Carpinteria, CA, USA*), capaz de identificar os miofibroblastos (variação fenotípica dos ceratócitos). O anticorpo monoclonal anti-SMA do laboratório DAKO foi utilizado na concentração de 85 mg/L, com um período de incubação de uma hora em temperatura ambiente.

Em ambas as técnicas, utilizou-se o marcador nuclear DAPI (*Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA*). Lâminas contendo controles sabidamente positivos e negativos para Ki67 e SMA foram incluídas no ensaio rotineiramente. Para controle positivo de Ki67, utilizaram-se cortes de córnea de coelho submetido a PRK para alta miopia (-9,00 D) 24 horas antes do sacrifício, conforme descrito por Mohan *et al.* em 2003. Para o controle positivo de SMA, utilizaram-se cortes de córnea de coelho submetido a PRK para alta miopia (-9,00 D), três meses antes do sacrifício. Para o controle

negativo, utilizaram-se cortes de córnea de coelhos que não sofreram nenhum tipo de cirurgia para ambas as técnicas.

Após a finalização dos estudos imuno-histoquímicos, as lâminas do estudo e controles eram observados com o auxílio do microscópio fluorescente, modelo E800 (*Nikon*). Fotografias foram obtidas através dos recursos digitais da SPOT câmera (*Micro Video Instruments*; Avon, MA, USA).

Análise biomicroscópica e quantificação da opacidade corneana

Para a quantificação da opacidade corneana, os animais foram avaliados à lâmpada de fenda (*Haag-Streit BM900, Haag-Streit, Switzerland*) quatro semanas após a cirurgia e sob anestesia geral. A quantificação da opacidade corneana foi feita de acordo com a classificação previamente descrita por Fantes e colaboradores, em 1990, que consideram grau zero de opacidade quando a córnea se apresenta completamente transparente; grau 0,5, quando existem pequenos traços de opacidade corneana; grau I, quando a opacidade corneana é mais acentuada, não interferindo na visualização de detalhes da íris; grau II, quando existe uma leve dificuldade para a visualização de detalhes da íris; grau III, quando existe uma dificuldade moderada para a visualização de detalhes da íris; grau IV, quando existe significativa opacidade corneana, impedindo a visualização de detalhes da íris.

Contagem celular para quantificação do ensaio de TUNEL e ensaios imuno-histoquímicos

Para a análise de cada tecido corneano, utilizaram-se dez lâminas com três cortes histológicos. Foram feitos cortes em faixa (sagitais) contendo toda a extensão e profundidade corneanas. A contagem de ceratócitos foi feita por um único observador. Selecionaram-se diferentes áreas da região central da córnea, cuja extensão era determinada pelo campo de visão do microscópio (na magnificação total de 400x).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio de um *software* (*Statview 4.5, Abacus Concepts*, Berkeley, CA, USA). As variâncias foram expressas como desvios padrões médios. As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) com o ajuste de Bonferonni-Dunn para medidas repetidas. Todos os testes estatísticos foram conduzidos considerando-se um nível de alfa de 0,05.

4.5 APROVAÇÃO DO ESTUDO

O protocolo deste estudo foi aprovado previamente pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – *CAPPesq* da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 533/05 [Anexo I]) e pelo Comitê de Pesquisa em Animais do *Lerner Research Building* e *Cole Eye Institute* da *The Cleveland Clinic Foundation* (Protocolo TX – 0126 – A 02 [Anexo II] – *Effect of prophylactic and therapeutic mitomycin C on corneal apoptosis, proliferation, haze and long-term keratocyte density*).

5 RESULTADOS

OPACIDADE CORNEANA (ANÁLISE BIOMICROSCÓPICA)

Evidenciou-se uma variabilidade na intensidade de formação da opacidade corneana entre diferentes animais de todos os grupos profiláticos e terapêuticos (tabela 2). A opacidade corneana tornou-se mais pronunciada após duas semanas de cirurgia com pico máximo por volta da quarta semana. Essa opacidade ocorreu apenas na área onde foi feita a fotoablação corneana, com a presença de uma nítida linha demarcatória entre a região ablada e a não ablada, independentemente da extensão da área desepitelizada (figura 2). A opacidade corneana encontrada teve localização subepitelial, com ocasional extensão para regiões posteriores do estroma. O grupo submetido à aplicação de solução salina balanceada apresentou grau significativamente maior ($p < 0,001$) de opacidade corneana após quatro semanas de cirurgia, quando comparado com os grupos submetidos à aplicação de mitomicina C (tabela 2). Entretanto, o uso da mitomicina C tópica não foi suficiente para eliminar completamente o aparecimento de opacidades corneanas. Nos grupos submetidos à aplicação profilática de mitomicina C, foram identificadas córneas que desenvolveram opacidade corneana grau 0,5 quatro semanas após a cirurgia. Além disso,

duas córneas do grupo submetido à aplicação profilática de mitomicina C, na concentração de 0,002% por 12 segundos, desenvolveram opacidade corneana grau I quatro semanas após a cirurgia. Entre os diversos grupos profiláticos submetidos à aplicação de mitomicina C, só houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos profiláticos P1 (mitomicina C 0,02% por dois minutos) e P6 (mitomicina C 0,002% por 12 segundos).

Em todas as córneas, que desenvolveram opacidade, acompanhadas durante seis meses, observou-se uma importante ($p < 0,05$) diminuição de sua intensidade após seis meses. Nenhuma córnea submetida à aplicação de mitomicina C com intuito profilático desenvolveu qualquer grau de opacidade durante o período de seis meses de seguimento.

A análise dos grupos terapêuticos (T-I e T-II), após quatro semanas da aplicação da mitomicina ou solução salina, evidenciou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quanto à intensidade de opacidade corneana entre os grupos T-I (opacidade tratada com mitomicina C) e T-II (opacidade tratada com solução salina), (tabela 2).

ANÁLISE DA APOPTOSE CELULAR NO ESTROMA CORNEANO

O fenômeno de apoptose dos ceratócitos foi identificado na região do estroma anterior de todas as córneas submetidas ao PRK para corrigir -9,00 dioptrias, com ou sem a aplicação de mitomicina C. O pico de apoptose

ocorreu após quatro horas do procedimento e acentuou-se 24 horas após a cirurgia (figura 2). Na região do estroma posterior e endotélio corneano, a identificação de ceratócitos sofrendo apoptose ocorreu como evento isolado, em apenas uma lâmina. Verificou-se um número significativamente maior ($p < 0,05$) de ceratócitos sofrendo apoptose no estroma anterior de córneas submetidas à aplicação de mitomicina C (em todas as concentrações e tempos de exposição) em comparação com o grupo de controle. Embora não se tenha constatado uma diferença estatisticamente significativa, observou-se uma tendência de diminuição do número de ceratócitos sofrendo apoptose nos grupos em que a mitomicina foi aplicada em menores concentrações e por um tempo de exposição mais curto (figuras 3 e 4). Não foram observados ceratócitos sofrendo apoptose após quatro semanas de cirurgia.

Em todos os animais dos grupos terapêuticos, foram identificados ceratócitos sofrendo apoptose no estroma anterior. As córneas tratadas com mitomicina C (T-I) apresentaram um número significativamente maior de células sofrendo apoptose ($p < 0,05$) do que o grupo de controle (T-II), (figura 5). A dupla coloração com TUNEL e α -SMA mostrou que a mitomicina C foi capaz de induzir também a apoptose dos miofibroblastos em animais do grupo T-I (opacidade tratada com mitomicina C a 0,02%, por dois minutos), (figura 5).

ANÁLISE DA REPLICAÇÃO CELULAR NO ESTROMA CORNEANO

Em todos os grupos, foram evidenciadas células com coloração positiva para Ki-67 no estroma corneano entre quatro e 24 horas após a cirurgia, indicando intensa atividade proliferativa dos ceratócitos. Entretanto, observou-se um número significativamente maior de células proliferativas (Ki-67 positivas) no estroma anterior de córneas do grupo de controle (submetidas à aplicação de solução salina), comparado com as córneas submetidas à aplicação de mitomicina C após 24 horas da cirurgia ($p < 0,001$), (figuras 6 e 7). Entre as córneas dos diversos grupos profiláticos, submetidos a distintas concentrações e tempos de exposição da mitomicina C, só foi evidenciada diferença estatisticamente significativa quanto ao número de células proliferativas entre os grupos P- I (MMC 0,02% por dois minutos) e P-VI (MMC 0,002% por 12 segundos), ($p = 0,06$) .

Depois de quatro semanas, constatou-se uma diminuição significativa do número de células proliferativas em todos os grupos. Foram evidenciadas mais células proliferativas nos grupos submetidos à aplicação de solução salina do que em córneas dos grupos submetidos à aplicação de mitomicina C ($p < 0,05$), (figura 6).

Nos grupos terapêuticos, também se observaram mais células proliferativas no estroma anterior de córneas tratadas com solução salina (T-II) do que em córneas tratadas com mitomicina C (T-I) 24 horas ($p < 0,001$) e quatro semanas ($p < 0,05$) após a cirurgia.

FORMAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS NO ESTROMA CORNEANO

Não foram identificadas células α -SMA positivas (miofibroblastos) nas primeiras horas após o procedimento (quatro e 24 horas), em nenhum dos grupos. Por outro lado, constatou-se um número significativo de miofibroblastos no estroma anterior das córneas submetidas ao PRK, com subsequente aplicação de solução salina, após quatro semanas da cirurgia. Houve um número significativamente maior de miofibroblastos formados nas córneas submetidas à aplicação de solução salina em comparação com as córneas que receberam mitomicina C ($p < 0,001$) (figuras 8 e 9). Em todos os grupos profiláticos (submetidos à aplicação de mitomicina C), houve formação mínima de miofibroblastos, com diferença significativa encontrada somente entre os grupos P-I (MMC 0,02% a dois minutos) e P-VI (MMC 0,002% a 12 segundos) ($p < 0,05$). Contudo, o número de miofibroblastos no grupo P-VI foi significativamente menor do que no grupo de controle, submetido à aplicação de solução salina (C) ($p < 0,05$), (figura 9).

Nos grupos terapêuticos, os miofibroblastos foram identificados em todas as córneas após quatro horas de cirurgia, indicando a persistência dos miofibroblastos apesar da aplicação do *excimer laser* e da subsequente aplicação da mitomicina C. Entretanto, quatro semanas após a cirurgia, constatou-se um maior número de miofibroblastos no grupo tratado com solução salina em comparação com o grupo tratado com mitomicina C ($p < 0,05$). Quando se comparou a quantidade de miofibroblastos entre os grupos terapêuticos e profiláticos submetidos à aplicação de mitomicina C,

foi nítida a diferença entre ambos ($p < 0,05$), com maior quantidade de células α -SMA positivas nos grupos terapêuticos.

Seis meses após a cirurgia, observou-se uma diminuição significativa do número de miofibroblastos em todos os grupos ($p < 0,05$).

DENSIDADE DE CERATÓCITOS

A densidade de ceratócitos no estroma corneano foi medida pela identificação do núcleo celular com corante DAPI. Em todos os grupos submetidos à cirurgia de PRK, houve importante redução da densidade dos ceratócitos localizados na região anterior do estroma corneano em relação a córneas não operadas ($p < 0,05$). Além disso, houve uma redução significativa na densidade de ceratócitos em córneas tratadas com mitomicina C em relação às córneas tratadas com solução salina ($p < 0,01$), (figura 10). Nas córneas tratadas profilaticamente com mitomicina C, constatou-se um aumento progressivo da densidade de ceratócitos no estroma anterior da córnea quando se usaram concentrações mais baixas e menores tempos de exposição à mitomicina C. No entanto, houve diferença estatisticamente significativa na densidade de ceratócitos apenas entre os grupos P-I (MMC 0,02% por dois minutos) e P-VI (MMC 0,002% por 12 segundos), ($p = 0,04$).

Após seis meses de cirurgia, identificou-se persistência da densidade diminuída de ceratócitos no estroma anterior de córneas tratadas com

mitomicina C, em relação às córneas do grupo de controle (tratadas com solução salina) ($p < 0.001$), (figura 11).

6 *DISCUSSÃO*

A formação da opacidade corneana secundária a procedimentos cerato-refrativos permanece como uma das principais complicações cirúrgicas. Sua ocorrência é significativamente mais comum em olhos submetidos ao PRK para correção de altas ametropias (Siganos *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 1998). Essa alteração ocorre quase sempre bilateralmente, indicando um mecanismo celular ou desordem metabólica de base, ou mesmo influência de fatores ambientais em pacientes que, certamente, apresentam um fator predisponente. Netto e colaboradores demonstraram, recentemente, que a irregularidade da superfície associada a defeitos na regeneração da membrana basal estão relacionados com o aparecimento da opacidade corneana após PRK (Netto *et al.*, 2006). Stramer e colaboradores, em 2003, também identificaram a integridade da membrana basal como um elemento fundamental no processo de desenvolvimento da opacidade corneana.

O risco de formação de opacidade corneana limitou a indicação da cirurgia de PRK para a correção de baixas ametropias. Com isso, técnicas alternativas de ablação de superfície, como a criação de um *flap* epitelial com auxílio de solução alcoólica (LASEK) ou auxílio mecânico (Epi-LASIK), foram desenvolvidas recentemente (Camellin *et al.*, 2003; Pallikaris *et al.*,

2003). Contudo, ainda não há evidência científica que comprove a formação menor de opacidade corneana após tais procedimentos (Anderson *et al.*, 2002; Taneri *et al.*, 2004; Kervick *et al.*, 2005; Netto *et al.*, 2005b).

Mais recentemente, estudos experimentais têm sugerido a aplicação tópica da mitomicina C durante a cirurgia de PRK para a prevenção da formação da opacidade corneana (Majmudar *et al.*, 2000; Talamo *et al.*, 2001; Carones *et al.*, 2002). Na seqüência, alguns estudos clínicos reforçaram os potenciais benefícios da MMC na prevenção da opacidade corneana após o PRK (Carones *et al.*, 2002). Em 2005, Gambato e colaboradores demonstraram, em um estudo contralateral envolvendo 36 pacientes e um tempo de seguimento médio de 18 meses (variando entre 12 e 36 meses), a eficácia da mitomicina C na prevenção da opacidade corneana pós-PRK para a correção de altas miopias, quando comparada com o placebo. Os autores não identificaram efeitos colaterais secundários ao tratamento em questão durante o tempo de seguimento do estudo.

Em consequência a esses estudos e confirmando a eficácia da mitomicina C na prevenção da opacidade corneana, seu uso popularizou-se rapidamente entre os cirurgiões refrativos. Desse modo, a mitomicina C vem sendo empregada, hoje, de forma rotineira por muitos cirurgiões, independentemente da ametropia a ser corrigida. As diferentes concentrações e os distintos tempos de exposição da mitomicina C atualmente empregados foram sugeridos aleatoriamente, na ausência de estudos científicos que confirmem suas possíveis vantagens e desvantagens. Até o momento, não

há estudo que compare os riscos e benefícios ou que indique a concentração e o tempo de exposição ideais da mitomicina a ser utilizada. Além disso, não há na literatura estudo que demonstre o mecanismo de ação da mitomicina na prevenção da opacidade corneana e, principalmente, seus possíveis efeitos colaterais.

O presente estudo avaliou a eficácia da mitomicina C quando utilizada de forma profilática e terapêutica, em diferentes concentrações e tempos de exposição, bem como analisou seu mecanismo de ação na prevenção e tratamento de opacidades corneanas.

Optou-se pelo modelo animal porque se faz indispensável o uso do estudo *in vivo* dos eventos que compõem a resposta cicatricial. O estudo foi realizado em coelhos devido à sua facilidade de manuseio e à importante semelhança anatômica entre o olho humano e olho de coelho. Estudos prévios, como o de Ambrósio Jr. (2004), demonstraram que a seqüência de eventos celulares, componentes da resposta cicatricial da córnea, em humanos é quantitativamente e qualitativamente muito semelhante à seqüência de eventos celulares observadas em coelhos submetidos ao mesmo procedimento. Esse trabalho identifica uma analogia parcial entre as respostas cicatriciais observadas em córneas humanas e em córneas de coelhos, fazendo desses animais uma das melhores opções para o estudo de procedimentos realizados na córnea.

A aplicação do *excimer laser* para corrigir -9.0D, com a técnica de PRK, é capaz de induzir opacidade corneana em 100% dos olhos de coelhos

tratados, de acordo com estudos prévios (Mohan *et al.*, 2003). Tal fato é importante para aumentar a reprodutibilidade dos procedimentos. Os pontos de análise também foram estabelecidos com base em informações de trabalhos anteriores em que foram caracterizados os picos dos eventos celulares mais relevantes para o estudo. Dessa forma, o ponto de análise das quatro horas foi selecionado por coincidir com o pico de apoptose celular. O ponto de análise das 24 horas foi selecionado por coincidir com o pico de proliferação dos fibroblastos. E, o ponto de análise das quatro semanas foi estabelecido por coincidir com o pico de formação dos miofibroblastos. Finalmente, o ponto de análise dos seis meses foi selecionado para estudo da densidade dos ceratócitos a médio prazo.

A grande maioria dos estudos até então realizados com a MMC na córnea utilizavam apenas parâmetros considerados subjetivos para a avaliação da opacidade corneana. A identificação e a classificação da opacidade corneana, em diferentes níveis de intensidade, com o uso da lâmpada de fenda são realizadas com significativa subjetividade. A classificação de Fantes, apesar de bastante divulgada e utilizada em diversos estudos prévios, não permite uma análise objetiva do grau de opacidade corneana. No presente estudo, a utilização de anticorpos específicos, como o α -SMA, permitiu a identificação das células diretamente responsáveis pela opacidade corneana, possibilitando uma classificação e avaliação mais objetivas das alterações corneanas.

Os resultados deste estudo confirmam a eficácia da mitomicina C tópica na prevenção e tratamento de opacidades corneanas em modelo animal. Contudo, sua ação profilática mostrou-se mais eficiente do que sua ação terapêutica. Em relação às diferentes concentrações e tempos de exposição testados, observou-se que menores concentrações (0,002%) e períodos mais curtos de exposição (12 segundos) também são eficazes na prevenção de opacidades corneanas após PRK. Entretanto, constatou-se um número significativamente maior de miofibroblastos ($P = 0.04$) após um mês de cirurgia, em córneas do grupo P-VI (MMC 0,002% por 12 segundos), em comparação com o grupo P-I (MMC 0.02% por dois minutos). Porém se presume que tal nível de opacidade observada no grupo P-VI não seja clinicamente relevante (tabela 2).

Em relação ao modo de ação da mitomicina C no tecido corneano, observou-se que ela induz uma maior quantidade de apoptose dos ceratócitos em comparação com o grupo de controle. Tais observações confirmam os resultados descritos por Kim e colaboradores, em 2003, os quais demonstraram a indução de apoptose celular pela mitomicina C em estudos *in vitro*. O presente estudo identificou a inibição da proliferação dos ceratócitos, bem como de outras células progenitoras de miofibroblastos, como o principal mecanismo pelo qual a mitomicina C inibe a formação de opacidades corneanas. Esses achados justificam a menor eficácia da mitomicina no tratamento de opacidades anteriormente existentes. Nesse caso, é ideal que se faça a remoção ativa dos miofibroblastos por meio de debridamento mecânico ou por meio de *laser*, visto que a maior ação da

mitomicina C será a prevenção da proliferação dessas células e não a sua eliminação pelo mecanismo de apoptose.

A inibição ou diminuição da formação dos miofibroblastos reduz a formação de uma matriz estromal anômala, caracterizada pela transparência diminuída. Pequenas variações no nível de opacidade corneana foram encontradas em todos os grupos tratados com mitomicina C, confirmando a variabilidade individual da resposta cicatricial entre diferentes animais de uma mesma espécie. Tal variabilidade é também responsável pelos diferentes níveis de opacidade corneana, esporadicamente observada em humanos após a cirurgia de PRK (Maldonado *et al.*, 2002).

No que diz respeito aos efeitos colaterais e complicações, não foram evidenciadas alterações endoteliais importantes. O achado de células endoteliais sofrendo apoptose foi um evento extremamente raro e não houve diferença estatisticamente significativa entre as córneas tratadas com mitomicina C e seu respectivo grupo de controle. No entanto, o achado mais marcante foi a diminuição da celularidade no estroma anterior da córnea, nos grupos submetidos à aplicação de mitomicina C. Tal fato foi observado anteriormente por Alves, em 1996, em estudo experimental com coelhos submetidos à aplicação tópica da mitomicina C, por repetidas vezes, no epitélio corneano. Observação ainda mais relevante foi a constatação da persistência da baixa densidade celular aos seis meses de seguimento. Contudo, estudos com microscopia confocal *in vivo*, realizados em pacientes submetidos à cirurgia de PRK sem aplicação de mitomicina C, mostraram

uma diminuição da densidade de ceratócitos após longos períodos de seguimento (Erie *et al.*, 2003). O presente estudo mostrou uma diminuição significativamente maior ($p < 0,01$) na densidade celular de córneas submetidas ao PRK com mitomicina C, comparadas com o grupo de controle. Por outro lado, a diminuição da densidade celular foi significativamente menor no grupo P-VI (MMC 0.002% por 12 segundos), comparada com o grupo P-I (MMC 0,02% por 12 segundos) ($p = 0,04$). Tais observações indicam que a mitomicina C, quando usada em menores concentrações e por tempos de exposição mais curtos, é capaz de preservar mais ceratócitos. Não se identificaram alterações corneanas em nenhum dos grupos, nos exames de biomicroscopia. Mas se sabe que os ceratócitos têm participação fundamental na fisiologia da córnea, sendo diretamente responsáveis pela produção de componentes da matriz extracelular, os quais participam dos mecanismos de sustentação, reparação e transparência da córnea. Em função disso, é mandatório um maior tempo de seguimento para que se possa estabelecer a segurança da mitomicina C e afastar futuras possíveis complicações, decorrentes da reduzida celularidade estromal.

Com base nas informações apresentadas neste estudo, bem como nos resultados descritos na literatura, recomenda-se que o uso da mitomicina C seja cautelosamente ponderado. Face à pequeníssima incidência de opacidade corneana após PRK, nas baixas ametropias, acredita-se que seu uso seja desnecessário para correções de até cinco dioptrias, deixando seu uso reservado para situações de maior risco de

desenvolvimento de opacidade corneana. Mesmo nessas situações, seria recomendável o uso de concentrações menores e tempos de exposição mais curtos, capazes de manterem uma maior preservação celular.

Entretanto, é importante ressaltar o caráter experimental do estudo. Desse modo, é necessário parcimônia na generalização dos resultados para humanos a partir de resultados encontrados em estudos com coelhos.

7 CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo, realizado em coelhos submetidos à cirurgia de PRK com aplicação tópica de mitomicina C peroperatória em diferentes concentrações e tempos de exposição, verificou-se o exposto abaixo.

- **Eficácia da mitomicina C para inibir a formação de miofibroblastos no estroma anterior da córnea e minimizar o aparecimento de opacidade corneana.**
- **Eficácia limitada da mitomicina C para eliminar opacidades corneanas preexistentes.**
- **Indução de apoptose celular, no estroma anterior da córnea, pela mitomicina C.**
- **Bloqueio da replicação dos fibroblastos pela mitomicina C no estroma anterior da córnea, impedindo a formação de miofibroblastos.**
- **Toxicidade celular resultando no aparecimento de uma região de baixa densidade celular no estroma anterior da córnea.**
- **Eficácia e toxicidade diretamente proporcionais à concentração e ao tempo de exposição da mitomicina C no estroma corneano.**

8 REFERÊNCIAS

* De acordo com:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso e Valéria Vilhena. 2ª Edição. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2005.

Alves MR. Perda de ceratócitos após desepitelização da córnea e uso de mitomicina C. *Rev Bras Oftalmol*. 1996;55:267-75.

Alves MR, Saldiva PN, Lemos M, Kara-Jose N. Efeitos do uso tópico da mitomicina C no epitélio corneano de coelhos. Análise histopatológica pela morfometria. *Arq Bras Oftalmol*. 1996;59:431-7.

Ambrósio Jr R. *Estudo laboratorial da cicatrização de córneas humanas após debridamento epitelial* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

Anderson NJ, Beran RF, Schneider TL. Epi-LASEK for the correction of myopia and myopic astigmatism. *J Cataract Refract Surg*. 2002;28:1343-7.

Aron-Rosa D, Carre F, Cassiani P, Delacour M, Gross M, Lacour B et al. Keratorefractive surgery with the excimer laser. *Am J Ophthalmol*. 1985;100:741-2.

Boote C, Dennis S, Newton RH, Puri H, Meek KM. Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: optical and biomechanical implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:2941-8.

Camellin M. Laser epithelial keratomileusis for myopia. *J Refract Surg.* 2003;19:666-70.

Campos M, Szerenyi K, Lee M, McDonnell JM, McDonnell PJ. Keratocyte loss after corneal deepithelialization in primates and rabbits. *Arch Ophthalmol.* 1994; 112:254-60.

Carones F, Vigo L, Scandola E, Vacchini L. Evaluation of the prophylactic use of mitomycin-C to inhibit haze formation after photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg.* 2002;28:2088-95.

Chang SW. Early corneal edema following topical application of mitomycin-C. *J Cataract Refract Surg.* 2004;30:1742-50.

Cintron, C., Gregory, J. D., Damle, S. P., Kublin, C. L. Biochemical analyses of proteoglycans in rabbit corneal scars. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31:1975-81.

Denk PO, Knorr M. The in vitro effect of platelet-derived growth factor isoforms on the proliferation of bovine corneal stromal fibroblasts depends on cell density. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1997;235:530-4.

Dohlman CH, Gasset AR, Rose J. The effect of the absence of corneal epithelium or endothelium on stromal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1968; 7:520-34.

Dougherty PJ, Hardten DR, Lindstrom RL. Corneoscleral melt after pterygium surgery using a single intraoperative application of mitomycin-C. *Cornea*. 1996;15:537-40.

El-Maghraby A, Salah T, Waring GO 3rd, Klyce SD, Ibrahim O. Randomized bilateral comparison of excimer laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy for 2.50 to 8.00 diopters of myopia. *Ophthalmology*. 1999;106:447-57.

Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Keratocyte density in the human cornea after photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol*. 2003;121:770-6.

Fantes FE, Hanna KD, Waring GO 3rd, Pouliquen Y, Thompson KP, Savoldelli M. Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. *Arch Ophthalmol*. 1990;108:665-75.

Folger PA, Zekaria D, Grotendorst G, Masur SK. Transforming growth factor-beta-stimulated connective tissue growth factor expression during corneal myofibroblast differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:2534-41.

Fujita T, Tamura T, Yamada H, Yamamoto A, Muranishi S. Pharmacokinetics of mitomycin C (MMC) after intraperitoneal administration of MMC-gelatin gel

and its anti-tumor effects against sarcoma-180 bearing mice. *J Drug Target*. 1997;4:289-96.

Galm U, Hager MH, Van Lanen SG, Ju J, Thorson JS, Shen B. Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes, and mitomycin. *Chem Rev*. 2005;105:739-58.

Gambato C, Ghirlando A, Moretto E, Busato F, Midenia E. Mitomycin C modulation of corneal wound healing after photorefractive keratectomy in highly myopic eyes. *Ophthalmology*. 2005;112:208-18.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992;119:493-501.

Graf B, Pouliquen Y, Frouin MA, De Montaut F. The phenomena of reabsorption in the course of cicatrization of experimental wounds of the cornea (ultrastructural study). *Exp Eye Res*. 1972;13:24-32.

Helena MC, Baerveldt F, Kim W-J, Wilson SE. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:276-83.

Hersh PS, Stulting RD, Steinert RF, Waring GO 3rd, Thompson KP, O'Connell M et al. Results of phase III excimer laser photorefractive keratectomy for myopia. The Summit PRK Study Group. *Ophthalmology*. 1997;104:1535-53.

Holzer MP, Solomon KD, Vroman DT, Vargas LG, Sandoval HP, Kasper TJ et al. Diffuse lamellar keratitis: evaluation of etiology, histopathologic findings, and clinical implications in an experimental animal model. *J Cataract Refract Surg*. 2003;29:542-9.

Hong JW, Liu JJ, Lee JS, Mohan RR, Mohan RR, Woods DJ et al. Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:2795-803.

Ivarsen A, Laurberg T, Moller-Pedersen T. Characterisation of corneal fibrotic wound repair at the LASIK flap margin. *Br J Ophthalmol* 2003;87:1272.8.

Jampel HD. Effect of brief exposure to mitomycin C on viability and proliferation of cultured human Tenon's capsule fibroblasts. *Ophthalmology*. 1992;99:1471-6.

Jester JV, Barry PA, Lind GJ, Petroll WM, Garana R, Cavanagh HD. Corneal keratocytes: in situ and in vitro organization of cytoskeletal contractile proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:730-43.

Jester JV, Moller-Pedersen T, Huang J, Sax CM, Kays WT, Cavanagh HD et al. The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *J Cell Sci*. 1999;112:613-22.

Jester JV, Huang J, Petroll WM, Cavanagh HD. TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res.* 2002;75:645-57.

Jester JV, Ho-Chang J. Modulation of cultured corneal keratocyte phenotype by growth factors/cytokines control in vitro contractility and extracellular matrix contraction. *Exp Eye Res.* 2003;77:581-92

Kaji Y, Amano S, Oshika T, Obata H, Ohashi T, Sakai H et al. Effect of anti-inflammatory agents on corneal wound-healing process after surface excimer laser keratectomy. *J Cataract Refract Surg.* 2000;26:426-31.

Kang SG, Chung H, Yoo YD, Lee JG, Choi YI, Yu YS. Mechanism of growth inhibitory effect of Mitomycin-C on cultured human retinal pigment epithelial cells: apoptosis and cell cycle arrest. *Curr Eye Res.* 2001;22:174-81.

Kervick G. Subepithelial scarring after laser-assisted subepithelial keratectomy. *J Cataract Refract Surg.* 2005;31:647-8.

Kim TI, Tchah H, Lee SA, Sung K, Cho BJ, Kook MS. Apoptosis in keratocytes caused by mitomycin C. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:1912-7.

Kurpakus MA, Daneshvar C, Davenport J, Kim A. Human corneal epithelial cell adhesion to laminins. *Curr Eye Res.* 1999;19:106-14.

Lee DH, Chung HS, Jeon YC, Boo SD, Yoon YD, Kim JG. Photorefractive keratectomy with intraoperative mitomycin-C application. *J Cataract Refract Surg.* 2005;31:2293-8.

Lohmann CP, Marshall J. Plasmin- and plasminogen-activator inhibitors after excimer laser photorefractive keratectomy: new concept in prevention of postoperative myopic regression and haze. *Refract Corneal Surg.* 1993;9:300-2.

Lovelace CIP, Zhang J, Vanek PG, Collier B. Detecting apoptotic cells in situ. *Biomed Prod.* 1996;21:76-7.

Majmudar PA, Forstot SL, Dennis RF, Epstein R. Topical mitomycin-C for subepithelial fibrosis after refractive corneal surgery. *Ophthalmology.* 2000;107:89-94.

Maldonado MJ. Intraoperative MMC after excimer laser surgery for myopia. *Ophthalmology.* 2002;109:826.

Maltseva O, Folger P, Zekaria D, Petridou S, Masur SK. Fibroblast growth factor reversal of the corneal myofibroblast phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:2490-5.

Maurice DM. The transparency of the corneal stroma. *Vision Res.* 1970;10:107-8.

McDonald MB, Beuerman R, Falzoni W, Rivera L, Kaufman HE. Refractive surgery with the excimer laser. *Am J Ophthalmol*. 1987;15:469-71.

Michelacci YM. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36:1037-46.

Miyamoto T, Saika S, Yamanaka A, Kawashima Y, Suzuki Y, Ohnishi Y. Wound healing in rabbit corneas after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg*. 2003;29:153-8.

Mohan RR, Liang Q, Kim WJ, Helena MC, Baerveldt F, Wilson SE. Apoptosis in the cornea: further characterization of Fas/Fas ligand system. *Exp Eye Res*. 1997;65:575-89.

Mohan RR, Kim WJ, Mohan RR, Chen L, Wilson SE. Bone morphogenic proteins 2 and 4 and their receptors in the adult human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:2626-36.

Mohan, R. R., Mohan, R. R., Kim, W. J., and Wilson, S. E. Modulation of TNF-alpha-induced apoptosis in corneal fibroblasts by transcription factor NF-kb. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:1327-34.

Mohan RR, Hutcheon AE, Choi R, Hong J, Lee J, Mohan RR et al. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Exp Eye Res*. 2003;76:71-87.

Moller-Pedersen T, Cavanagh HD, Petroll WM, Jester JM. Corneal haze development after PRK is regulated by volume of stromal tissue removal.

Cornea. 1998;17:627-39.

Morales AJ, Zadok D, Mora-Retana R, Martinez-Gama E, Robledo NE, Chayet AS. Intraoperative mitomycin and corneal endothelium after photorefractive keratectomy. *Am J Ophthalmol*. 2006;142:400-4.

Mulhern MG, Naor J, Rootman DS. The role of epithelial defects in intralamellar inflammation after laser in situ keratomileusis. *Can J Ophthalmol*. 2002;37:409-15.

Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S. The epidermal growth factor receptor (EGFR): role in corneal wound healing and homeostasis. *Exp Eye Res*. 2001;72:511-7.

Natarajan K, Chodosh J, Kennedy R. Innate immunity in the cornea: a putative role for keratocytes in the chemokine response to viral infection of the human corneal stroma. *Adv Exp Med Biol*. 2002;506:745-51.

Netto MV, Wilson SE. Corneal wound healing relevance to wavefront guided laser treatments. *Ophthalmol Clin North Am*. 2004;17:225-31.

Netto MV, Wilson SE. Indications for excimer laser surface ablation. *J Refract Surg*. 2005a;21:734-41.

Netto MV, Mohan RR, Ambrosio R Jr, Hutcheon AE, Zieske JD, Wilson SE.

Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. *Cornea*. 2005b;24:509-22.

Netto MV, Ambrosio R Jr, Chalita MR, Krueger RR, Wilson SE. Corneal wound healing response following different modalities of refractive surgical procedures *Arq Bras Oftalmol*. 2005c;68:140-9.

Netto MV, Mohan RR, Sinha S, Sharma A, Dupps W, Wilson SE. Stromal haze, myofibroblasts, and surface irregularity after PRK. *Exp Eye Res*. 2006;82:788-97.

Nuyts RM, Pels E, Greve EL. The effects of 5-fluorouracil and mitomycin C on the corneal endothelium. *Curr Eye Res*. 1992;11:565-70.

O'Brien T, Li Q, Ashraf MF, Matteson DM, Stark WJ, Chan CC. Inflammatory response in the early stages of wound healing after excimer laser keratectomy. *Arch Ophthalmol*. 1998;116:1470-4.

Pallikaris IG, Katsanevaki VJ, Kalyvianaki MI, Naoumidi II. Advances in subepithelial excimer refractive surgery techniques: Epi-LASIK. *Curr Opin Ophthalmol*. 2003;14:207-12.

Park CK, Kim JH. Comparison of wound healing after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis in rabbits. *J Cataract Refract Surg*. 1999;25:842-50.

- Patel SV, McLaren JW, Camp JJ, Nelson LR, Bourne WM. Automated quantification of keratocyte density by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:320-6.
- Pfister RR. Permanent corneal edema resulting from the treatment of PTK corneal haze with mitomycin: a case report. *Cornea*. 2004;23:744-7.
- Phan TM, Foster CS, Zagachin LM, Colvin RB. Role of fibronectin in the healing of superficial keratectomies in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989;30:386-91.
- Polack, F.M., Keratocyte loss after corneal deepithelialization in primates and rabbits. *Arch Ophthalmol*. 1994;112:254-60.
- Schipper I, Suppelt C, Gebbers JO. Mitomycin C reduces scar formation after excimer laser (193 nm) photorefractive keratectomy in rabbits. *Eye*. 1997;11:649-55.
- Seiler T, Wollensak J. In vivo experiments with the excimer laser--technical parameters and healing processes. *Ophthalmologica*. 1986;192:65-70.
- Shah SS, Kapadia MS, Meisler DM, Wilson SE. Photorefractive keratectomy using the summit SVS Apex laser with or without astigmatic keratotomy. *Cornea*. 1998;17:508-516.

Siganos DS, Katsanevaki VJ, Pallikaris IG. Correlation of subepithelial haze and refractive regression 1 month after photorefractive keratectomy for myopia. *J Refract Surg.* 1999;15:338-42.

Soriano ES, Campos MS, Aguiar JA, Michelacci YM. Effect of epithelial debridement on human cornea proteoglycans. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34:325-31.

Stramer BM, Zieske JD, Jung JC, Austin JS, Fini ME. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:4237-46.

Talamo JH, Gollamudi S, Green WR, De La Cruz Z, Filatov V, Stark WJ. Modulation of corneal wound healing after excimer laser keratomileusis using topical mitomycin C and steroids. *Arch Ophthalmol.* 1991;109:1141-6.

Taneri S, Zieske JD, Azar DT. Evolution, techniques, clinical outcomes, and pathophysiology of LASEK: review of the literature. *Surv Ophthalmol.* 2004;49:576-602.

Thom SB, Myers JS, Rapuano CJ, Eagle RC Jr, Siepser SB, Gomes JA. Effect of topical anti-transforming growth factor-beta on corneal stromal haze after photorefractive keratectomy in rabbits. *J Cataract Refract Surg.* 1997;23:1324-30.

Trokel SL, Srinivasan R, Braren B. Excimer laser surgery of the cornea. *Am J Ophthalmol.* 1983;96:710-5.

Tseng SH, Tsai YY, Chen FK. Successful treatment of recurrent corneal intraepithelial neoplasia with topical mitomycin C. *Cornea.* 1997;16:595-7.

Tuominen IS, Tervo TM, Teppo AM, Valle TU, Gronhagen-Riska C, Vesaluoma MH. Human tear fluid PDGF-BB, TNF-alpha and TGF-beta1 vs corneal haze and regeneration of corneal epithelium and subbasal nerve plexus after PRK. *Exp Eye Res.* 2001;72:631-41.

Vinciguerra P, Azzolini M, Airaghi P, Radice P, De Molfetta V. Effect of decreasing surface and interface irregularities after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis on optical and functional outcomes. *J Refract Surg.* 1998;14:S199-203.

Wachtlin J, Langenbeck K, Schrunder S, Zhang EP, Hoffmann F. Immunohistology of corneal wound healing after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg.* 1999;15:451-8.

Watanabe J, Sawaguchi S, Fukuchi T, Abe H, Zhou L. Effects of mitomycin C on the expression of proliferating cell nuclear antigen after filtering surgery in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1997;235:234-40.

Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1

system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing.

Exp Eye Res. 1996;62:325-7.

Wilson SE, Chen L, Mohan RR, Liang Q, Liu J. Expression of HGF, KGF, EGF and receptor messenger RNAs following corneal epithelial wounding.

Exp Eye Res. 1999;68:377-97.

Wilson SE, Mohan RR, Hutcheon AE, Mohan RR, Ambrosio R, Zieske JD et al. Effect of ectopic epithelial tissue within the stroma on keratocyte apoptosis, mitosis, and myofibroblast transformation. *Exp Eye Res.* 2003a;76:193-201.

Wilson SE, Netto M, Ambrosio R Jr. Corneal cells: chatty in development, homeostasis, wound healing, and disease. *Am J Ophthalmol.* 2003b;136:530-6.

Wilson SE, Mohan RR, Netto M, Perez V, Possin D, Huang J, Kwon R, Alekseev A, Rodriguez-Perez JP. RANK, RANKL, OPG, and M-CSF expression in stromal cells during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:2201-11.

Wu KY, Hong SJ, Huang HT, Lin CP, Chen CW. Toxic effects of mitomycin-C on cultured corneal keratocytes and endothelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther.* 1999;15:401-11.

Zieske JD, Wasson M. Regional variation in distribution of EGF receptor in developing and adult corneal epithelium. *J Cell Sci.* 1993;106:145-52.

9 TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos grupos profiláticos e terapêuticos

Grupos	Número de olhos por tempo de seguimento (n)	Grupos Profiláticos		Grupos Terapêuticos	
		PRK (-9.0D) seguido pela aplicação de:		PRK (-9.0D) há quatro semanas seguidos por:	
		MMC	SSB	Deseptelização + MMC	Deseptelização + SSB
P - I	6	MMC 0.02% por 2 min	-	-	
P - II	6	MMC 0.02% por 1 min	-	-	
P - III	6	MMC 0.02% por 12 seg	-	-	
P - IV	6	MMC 0.002% por 2 min	-	-	
P - V	6	MMC 0.002% por 1 min	-	-	
P - VI	6	MMC 0.002% por 12 seg	-	-	
T - I	6	-	-	MMC 0.02% por 2 min	
T - II	6	-	-	-	SSB por 2 min
C	6	-	SSB por 2 min	-	-

P – Profilático
 T – Terapêutico
 C - Controle
 MMC – Mitomicina C
 SSB – Solução salina balanceada
 Min – Minutos
 Seg - Segundos

Tabela 2 - Graduação da opacidade corneana através de análise biomicroscópica, quatro semanas após o procedimento cirúrgico.

Grupos / Grau de Opacidade	P - I MMC .02% 2 min n / (%)	P - II MMC .02% 1 min n / (%)	P - III MMC .02% 12 seg n / (%)	P - IV MMC .002% 2 min n / (%)	P - V MMC.002% 1 min n / (%)	P - VI MMC .002% 12 seg n / (%)	T - I DS + MMC .02% 2 min n / (%)	T - II DS + BSS n / (%)	C PRK - 9.0D + SSB n / (%)
Grau 0	3 (50.0%)	3 (50.0%)	2 (33.3%)	2 (33.3%)	2 (33.3%)	1 (16.6%)			
Grau 0.5	3 (50.0%)	3 (50.0%)	4 (66.6%)	4 (66.6%)	3 (50.0%)	3 (50.0%)	1 (16.6%)		
Grau 1					1 (16.6%)	2 (33.3%)	3 (50.0%)	1 (16.6%)	1 (16.6%)
Grau 2							2 (33.3%)	2 (33.3%)	2 (33.3%)
Grau 3								3 (50.0%)	2 (33.3%)
Grau 4									1 (16.6%)

P – Profilático
 T – Terapêutico
 C - Controle
 MMC – Mitomicina C
 SSB – Solução salina balanceada
 DS – Remoção epitelial
 Min – Mminutos
 Seg - Segundos

Figura 1 - Aplicação tópica da mitomicina C em córnea de coelho utilizando microesponja circular.

Figura 2 - Fotografias representativas da opacidade corneana, observada à lâmpada de fenda nos diferentes grupos. Opacidade leve (Grau 0,5 a 1,5) foi observada nos grupos profiláticos submetidos à aplicação de mitomicina C em diferentes concentrações e tempos de exposição (Grupos P-I a P-VI). Opacidade Grau II, observada em um animal do grupo terapêutico (T-1), cuja opacidade prévia foi tratada com desepitelização seguida de aplicação da mitomicina 0,02% por dois minutos. Opacidade moderada (Grau 3) foi observada no grupo de controle profilático (C) e no grupo terapêutico (T-II), cuja opacidade prévia foi tratada com desepitelização e aplicação de solução salina. É possível evidenciar a linha demarcatória entre a área submetida à aplicação do *excimer laser* (opaca) e a área não tratada (setas brancas). Magnificação de 10X.

P – Profilático
T – Terapêutico
C - Controle
MMC – Mitomicina C
DS – Desepitelização mecânica
SSB – Solução salina balanceada
Min – Minutos
Seg – Segundos

Figura 3 - Ensaio de imunofluorescência ilustrando a quantidade de células apoptóticas (marcadas pelo ensaio TUNEL) no estroma anterior corneano, quatro horas após a cirurgia refrativa (PRK) nos diferentes grupos submetidos à aplicação de mitomicina C e solução salina. Os núcleos celulares são marcados em azul (DAPI) e as células apoptóticas marcadas em vermelho (TUNEL-positivas). As setas brancas indicam as células sofrendo processo de apoptose (marcadas em vermelho). Magnificação de 200x.

P – Profilático
T – Terapêutico
C - Controle
MMC – Mitomicina C
DS – Desepitelização mecânica
SSB – Solução salina balanceada
Min – Minutos
Seg – Segundos

Figura 4 - Gráfico ilustrando a quantificação de células apoptóticas (TUNEL-positivas) no estroma anterior da córnea, após quatro horas do procedimento refrativo (PRK) em todos os grupos profiláticos e terapêuticos (em colunas com magnificação de 400x). (*, **, *** indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos) $p < 0,05$.

P – Profilático
 T – Terapêutico
 C - Controle
 MMC – Mitomicina C
 DS – Deseptelização mecânica
 SSB – Solução salina balanceada
 Min – Minutos
 Seg – Segundos

Figura 5 - Imunofluorescência dupla para os ensaios de TUNEL e α -SMA no estroma anterior, após quatro horas da cirurgia em córneas com opacidades preexistentes. Os núcleos celulares estão corados em azul (DAPI), enquanto células apoptóticas estão coradas em vermelho (TUNEL) e miofibroblastos estão corados em verde (α -SMA). Observam-se mais células apoptóticas no grupo terapêutico T-I (A) do que no grupo terapêutico controle T-II (B), bem como eventuais miofibroblastos sofrendo processo de apoptose (TUNEL-positiva e α -SMA-positiva). Magnificação de 200x.

T – Terapêutico

MMC – Mitomicina C

DS – Deseptelização mecânica

SSB – Solução salina balanceada

Min – Minutos

α -SMA – Anticorpo contra actina muscular lisa do tipo alfa

Figura 6 - Imunofluorescência com anticorpo Ki67 corando células em atividade mitótica na região central da córnea, 24 horas e quatro semanas após o procedimento (PRK), seguido da aplicação de mitomicina C ou solução salina (controle). Observa-se importante atividade proliferativa (células coradas em verde pelo anticorpo Ki67) nos grupos tratados com solução salina, enquanto mínima atividade proliferativa é detectada nos grupos tratados com mitomicina C. Observa-se também uma menor atividade proliferativa nos grupos profiláticos submetidos à aplicação de mitomicina C, em alta concentração e maior tempo de exposição. Magnificação 200X.

P – Profilático
T – Terapêutico
C - Controle
MMC – Mitomicina C
DS – Deseptelização mecânica
SSB – Solução salina balanceada
Min – Minutos
Seg – Segundos
Sem - Semanas

Figura 7 - Gráfico ilustrando a quantificação de células proliferativas (Ki67) no estroma anterior da córnea, após quatro horas do procedimento refrativo (PRK) em todos os grupos profiláticos e terapêuticos (em colunas com magnificação de 400x). (*, **, *** indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos) $p < 0,05$.

P – Profilático
 T – Terapêutico
 C - Controle
 MMC – Mitomicina C
 DS – Desepitelização mecânica
 SSB – Solução salina balanceada
 Min – Minutos
 Seg – Segundos

Figura 8 – Imunofluorescência com anticorpo α -SMA corando miofibroblastos na região central da córnea, quatro semanas após o procedimento (PRK) seguido da aplicação de mitomicina C ou solução salina (controle). O núcleo das células está corado em azul (DAPI) e os miofibroblastos estão corados em verde (setas). Nas córneas tratadas com mitomicina C, observa-se a presença de poucos miofibroblastos abaixo de uma linha paucicelular localizada no estroma anterior. Nas córneas tratadas com solução salina, observa-se um grande acúmulo de miofibroblastos imediatamente abaixo do epitélio. Também é possível observar uma maior concentração de ceratócitos no estroma anterior dos grupos profiláticos (P-IV, P-V, e P-VI), comparados aos grupos terapêuticos (P-I, P-II e P-III). Magnificação de 400X.

P – Profilático

T – Terapêutico

C - Controle

MMC – Mitomicina C

DS – Desepitelização mecânica

SSB – Solução salina balanceada

Min – Minutos

Seg – Segundos

α -SMA – Anticorpo contra actina muscular lisa do tipo alfa

Figura 9 - Gráfico ilustrando a quantificação de miofibroblastos (corados pelo anticorpo α -SMA) no estroma anterior da córnea (por colunas magnificadas 400X), quatro semanas após a cirurgia de PRK, em todos os grupos tratados com mitomicina C ou solução salina. (*, **,*** indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos) $p < 0,05$.

P – Profilático

T – Terapêutico

C - Controle

MMC – Mitomicina C

DS – Deseptelização mecânica

SSB – Solução salina balanceada

Min – Minutos

Seg – Segundos

α -SMA – Anticorpo contra actina muscular lisa do tipo alfa

Figura 10- Gráfico ilustrando a quantificação de ceratócitos (corados através do marcador nuclear DAPI) no estroma anterior (por coluna de 400X), quatro semanas após a cirurgia a laser nos gupos tratados com mitomicina C (profilaticamente ou terapeuticamente) ou solução salina balanceada. (*, **, *** indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos) $p < 0,05$

P – Profilático
 T – Terapêutico
 C - Controle
 MMC – Mitomicina C
 DS – Deseptelização mecânica
 SSB – Solução salina balanceada
 Min – Minutos
 Seg – Segundos

11 ABREVIATURAS E SIGLAS

ARVO –	Associação para pesquisa das ciências visuais e ópticas.
α -SMA –	Anticorpo contra actina muscular lisa do tipo alfa
C –	Grupo controle
DAPI –	anticorpo marcador nuclear
D –	dioptria
DS –	Deseptelização mecânica
ed. –	Editores
<i>et al.</i> –	e outros autores
E.U.A. –	Estados Unidos da América
FCE –	fator de crescimento epitelial
FCP –	fator de crescimento plaquetário
FMO –	fator medular ósseo
IL-1 –	interleucina 1
in –	em
Ki67 –	Anticorpo marcador de síntese celular
Kg -	kilograma
Laser –	<i>“light amplification by stimulated emission”</i>
LASIK –	<i>Laser in situ keratomileusis</i>
Mg –	miligrama
Min -	minuto
mm -	milímetro

MMC –	mitomicina C
MVN –	Marcelo Vieira Netto
µm –	micrômetro
mm –	milímetro
OCT –	solução para criopreservação do tecido
P –	grupo profilático
<i>p</i> –	probabilidade de erro
p. –	página
PRK –	<i>Phototherapeutic keratectomy</i>
Seg –	segundo
Sem -	semana
SSB –	solução salina balanceada
T –	grupo terapêutico
TGF-beta –	fator de crescimento transformador beta
TNF-alpha –	fator de necrose tumoral alfa
TUNEL –	(TdT-mediated dUTP nick end labeling). Ensaio enzimático capaz de identificar fragmentos do DNA nuclear, indicadores do processo de apoptose.
% -	porcentagem, por cento
* -	diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

ANEXO I – Aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28.07.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **533/05**, intitulado: "Efeitos Profilático e Terapêutico da Mitomicina C em opacidades corneanas" apresentado pelo Departamento de OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CAPPesq, os relatórios parcial e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Profº Drº Newton Kara José

Pesquisador(a) Executante: Drº Marcelo Vieira Netto

CAPPesq, 28 de Julho de 2005.

PROF. DR. CLAUDIO LEONE

Vice-Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

ANEXO II – Aprovação pela Comissão de Ética e Pesquisa em Animais da
The Cleveland Clinic Foundation.

January 5th 2004

COLE EYE INSTITUTE
CLEVELAND CLINIC

From: Animal Care Committee
Lerner Research Building of the Cleveland Clinic Foundation
Research Division Center
The Cleveland Clinic Foundation
Cleveland, OH
Tel: 216.991.1621 / 445.8502
Fax: 216.445.7636
E-mail: acc@ccf.org

To: Steven E. Wilson, MD
Principal Investigator
Cole Eye Institute

Dear Dr. Wilson,

We are pleased to inform you that your project entitled "Analysis of corneal haze formation following mitomycin C application in rabbit corneas" - TX - 0126 - A 02 was carefully evaluated by our staff and is currently in agreement with all ACC requirements for conducting research in live animals.

The project is ultimately approved and may be conducted under the full supervision of the principal investigator. Any unexpected events must be immediately reported to our emergency center at extension 9934. Any modification to the current project needs justification and written approval by the committee.

Please let me know if the ACC could be of any further help.

Sincerely yours,

Donna Lock

ACC Director