



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

FERNANDO JOSÉ XAVIER DE LIRA

**Uso do meio Roswell Park memorial Institute (RPMI) como conservante de
córneas de camundongos Swiss**

RECIFE

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**USO DO MEIO ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE (RPMI)
COMO CONSERVANTE DE CÓRNEAS DE CAMUNDONGO SWISS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de MESTRE em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco

Mestrando: Fernando José Xavier De Lira

Orientador: Prof. Dr. Fabrício B. de Sá

**RECIFE
2012**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Fabrício Bezerra de Sá, (DMFA) pelo convite, pela confiança e oportunidade.

A Dra. Ana Catarina Delgado do banco de olhos do Recife, pela doação do Optisol GS, possibilitando com isso um melhor resultado comparativo na minha pesquisa.

A minha mãe Geraldina Xavier de Lira, por sempre ter acreditado em meus esforços.

A meu pai José Matias de Lira (In Memoriam), pelo exemplo, pelo caráter e pela fé.

Ao meu tio José Antônio de Lira, pela amizade, pelo exemplo e pela confiança.

Ao Professor Marcos Antônio Lemos de Oliveira, (DMV) pelo crédito a mim confiado.

Ao Professor George Chaves Jimenez (DMFA) Pela amizade e pela força.

A Professora. Maria José de Sena (PREG) Pelo incentivo e por acreditar nos meus esforços.

A Professora Evilda (DMV) pelo estágio que resultou em tudo isso.

A Professora Eneida Wilco Rego (DMV) pelo incentivo e pelo crédito

Ao Professor Paulo Lima (DMV) pelo crédito e pela força.

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, por ter-me proporcionado às condições necessárias aos experimentos e a manutenção.

Aos professores, funcionários alunos e colaboradores que influíram e influem na minha formação e volta à prática da medicina veterinária, muito obrigado!

Aos funcionários e colaboradores do Hospital veterinário da UFRPE, muito obrigado!

A todos os que fizeram e fazem parte do Laboratório de Oftalmologia experimental do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Em especial aos colegas: Bruno Oliveira, Fabiana Félix, Taciana Spinelli, Maína Almeida, Elton Hugo, Alexandre Melo, Rita de Cássia e Elaine, Maria Clara e Jéssica.

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente nesta minha volta ao aprendizado da medicina veterinária e que acreditaram na minha vontade e capacidade de evoluir.

Ao meu amigo Tom Secretário do (PPGCV) pela paciência e pelas ajudas que me deu durante todo o curso quando perdia o acesso ao siga.

Ao amigo Clodomir Guedes Lopes Filho pela insistência e ajuda que deu no meu retorno à clínica.

.A Deus pelo corpo são e a mente sã.

SUMÁRIO

CAPITULO I

Introdução	6
Revisão de literatura	8
Córnea	9
Meios de Preservação da córnea	10
Referências	13

CAPITULO II

Artigo científico a ser enviado à revista	16
Introdução.....	17
Material e Métodos	18
Animais.....	18
Coleta e Processamento das Córneas	18
Resultados e discussão.....	20
Referências	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografia da córnea controle de camundongo em corte transversal corada em H.E. 21.

Figura 2. Fotomicrografia da córnea de camundongo em corte transversal corada em H.E. Mantidas em conservante por 4 dias em RPMI (A) e Optisol GS[®] (B). Em A evidencia-se grandes alterações no epitélio como perda da camada escamosa, vacuolizações intra e extracelulares, com mudanças estruturais no estroma adjacente. Em B há apenas um desprendimento da camada escamosa. 22

Figura 3. Fotomicrografia da córnea de camundongo em corte transversal corada em H.E. mantidas em conservante por 7 dias em RPMI (A) e Optisol GS[®] (B). Em A, observa-se uma desorganização estrutural e completa alteração da forma padrão corneal, ainda preservada em B. 21

Figura 4. Espessura em micrometros e diferentes intervalos de tempo nas quais as córneas foram mantidas nos meios RPMI e Optisol GS[®]. 22

Figura 5. Córnea de camundongo em corte transversal, corada em H.E. após quatro dias em RPMI, evidenciando a perda das células endoteliais (seta). 23

Figura 6. Eletromicrografia de varredura do endotélio corneal de camundongo mantida por 4 dias em meio RPMI. Evidenciam-se células de padrão irregular quanto ao tamanho e projeções na região de junção. 23

Figura 7. Eletromicrografia de varredura do endotélio corneal de camundongo mantida por 4 dias em meio RPMI. Evidenciam-se sinais de destruição celular como aumento de sua porosidade (seta), alongamento de suas projeções polipodais (cabeça de seta). 24

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

MEM- MEIO ESSÊNICAL MINIMO

RPMI- ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE

MK- MC CAREY-KAUFMAN

HE- HEMATOXILINA EOSINA

CAPITULO I

INTRODUÇÃO

Em humanos e animais de companhia, as doenças da córnea podem progredir ameaçando a integridade do globo ocular e da visão. Muitos casos respondem ao tratamento clínico porém casos mais sérios só respondem realmente ao tratamento cirúrgico. Para manter a visão, preservar a córnea em sua integridade ou resgatar o globo ocular como uma condição de manutenção das características faciais do paciente existem vários tipos de procedimentos cirúrgicos (ANDREW et al., 1999; BUSSIERES et al., 2004). A ceratoplastia penetrante é a forma mais próspera e mais utilizada entre todos os tipos de transplantes existentes (GABRIC et al., 1999), sendo a única maneira para tratamentos de doenças que possam provocar cegueira (THIEL et al., 2003; GEORGE e LARKIN, 2004). A porcentagem de sucesso, mesmo para pacientes que tenham córneas sem vascularização, ou até aqueles que têm problema de imunossupressão fica em torno de 95% (GABRIC et al., 1999; THIEL et al., 2003). Existem uma infinidade de infecções da córnea que necessitam de ceratoplastia penetrante. Desde o carcinoma das células escamosas, passando pelos traumas, queimaduras da córnea, degeneração e distrofia endotelial, ceratite superficial crônica, opacificação da córnea, cirurgia de catarata e ceratocone (ANDREW et al., 1999; CHAVES et al., 2002; GEORGE e LARKIN, 2004).

A ceratoplastia penetrante é um procedimento onde um botão da córnea danificada é retirado e é substituído por outro de espessura total de uma córnea de doador saudável. Este procedimento só é indicado, quando a transparência da córnea é perdida irreversivelmente obstruindo a visão por completo. (ALVIM et al., 2003). Os procedimentos para transplantes de córneas em medicina veterinária não têm sido constantes (NOGUEIRA e VASCONCELOS, 2000) pelas limitações encontradas nas disponibilidades de doadores (GILGER e WHITLEY, 1998), no tempo necessário para se fazer uma boa triagem do animal receptor, como exames complementares, bioquímica do sangue, transporte da córnea doadora e principalmente o tempo de estocagem desta córnea, enquanto todos esses procedimentos

estão sendo realizados. Os custos com os conservantes ainda são também uma barreira para viabilizar esse procedimento (NOGUEIRA e VASCONCELOS, 2000).

O endotélio corneano tem função de remover e transportar fluidos para a câmara anterior devido à presença de uma bomba ativa que regula a hidratação da matriz colágena do estroma e fornece à mesma uma resistência mecânica. (WHITLEY e GILGER, 1998). Formada por camada única de células escamosas hexagonais, o endotélio tem uma permeabilidade relativa, proporcionando a passagem da água como também de moléculas maiores como a glicose e outros elementos nutritivos. (ARDNT et al., 2001) O comprometimento da função endotelial por traumas ou patologias que o afetem, permite o extravasamento de água em excesso para o interior do estroma, rompendo as fibras colágenas no seu arranjo natural, provocando deste modo a opacificação da córnea. (WHITLEY e GILGER, 1998; SLATER e HAKANSON, 1998; ARNDT et al., 2001).

Uma das formas mais comuns e mais prósperas em transplantes de tecidos sólidos em humanos é o transplante de córneas. O sucesso do transplante depende de fatores como, a escolha do doador, coleta adequada e a forma de preservação, sendo a última a mais importante para que se tenha êxito (ARNDT et al., 2001; ALVIM et al., 2003). Os três principais tipos de armazenamento de células para preservação de córneas com células vivas são: meio para cultura de órgãos, hipohidratação por hipotermia e criopreservação. As técnicas para criopreservação de córneas foram desenvolvidas na década de 1960 e aplicadas clinicamente (GAIN et al, 2001). O meio de cultura essencial mínimo de Eagle[®] (MEM) é mais comumente utilizado para conservação de órgãos. Este é acrescido de diferentes concentrações de soro fetal bovino, podendo chegar até 8%. A maioria dos bancos de olhos inclui a penicilina e a anfotericina B nos seus meios como forma de preservar a esterilidade durante o armazenamento. (ARNDT et al., 2001; JENG. 2006)

Frequentemente cães e gatos são acometidos de úlceras corneais que quando não tratadas corretamente deixam cicatrizes levando o animal a um

quadro de cegueira uni ou bilateral. Nestes casos só resta à terapia cirúrgica que basicamente consiste em substituição do segmento lesado por uma membrana biológica, como por exemplo, uma córnea total ou parte desta. A maior limitação na medicina veterinária é simplesmente a aquisição dos meios já padronizados para a preservação de córneas doadoras, pois estes tem custo elevado. Com isso ressalta-se a necessidade de novos estudos com meios de preservação de baixo custo e eficientes para que as terapias com transplantes ou enxertos se tornem viável e rotineira na oftalmologia veterinária.

REVISAO DE LITERATURA

A principal preocupação e objetivo na ceratoplastia penetrante é a obtenção de um endotélio viável onde esteja preservada a maior quantidade de células e que sua integridade esteja mantida. (GILGER e WHITLEY, 1998; ARNDT et al., 2001). Em medicina veterinária a manutenção de uma córnea preservada por um longo período, é um procedimento que despense um alto custo e não é um procedimento muito prático em sua rotina. Um endotélio viável geralmente provem de um animal jovem, por apresentar células saudáveis, mas o tempo que decorre entre a enucleação e o uso deste tecido, precisa ser o menor possível (logo após o óbito ou no máximo até seis horas decorridas deste) para diminuir a possibilidade de danos neste tecido (GILGER e WHITLEY,1998). Mesmo com este período de tempo reduzido exames sorológicos e microscopia especular são necessários para garantirem a viabilidade das córneas e estado geral das células que a compõem (ALBON et al., 2000; MOLLER-PEDERSEN et al., 2001; ALVIM et al., 2003).

Os meios para preservação estão voltados principalmente para preservação da função endotelial que por suas características fisiológicas garantem a transparência da córnea mantendo-a desidratada ainda que em meio líquido.

CÓRNEA

A córnea é uma parte integral da túnica fibrosa de suporte. Embora densa e resistente, tem a qualidade de ser transparente e, assim permite que a luz entre no olho. Desempenha um papel importante na refração, ou seja, é capaz como a lente de curvar o feixe de luz de forma que o que é visto pelo animal seja suficientemente reduzido para ser focalizado na retina (SAMUELSON, 1988).

A córnea consiste de quatro camadas: epitélio externo, estroma, membrana descemente e endotélio. É composta por um tipo especial de tecido conjuntivo denso, disposto em forma lamelar. Apesar da cuidadosa distribuição das suas fibras, a sua transparência não é somente um fenômeno estrutural, mas também fisiológico e depende do bombeamento contínuo de líquidos intersticiais, processo que ocorre a partir do endotélio corneano. Estruturalmente a córnea é revestida por um epitélio não queratinizado e estratificado. As células basais desse epitélio estratificado estão firmemente aderidas à lâmina basal através dos hemidesmossomos que estão ancorados às fibras colágenas e glicoproteínas como a laminina. A camada epitelial é contínua com o epitélio da conjuntiva, ao passo que a camada epitelial posterior (endotélio) une-se à superfície anterior da íris através do ângulo iridocorneal. Sua espessura varia com as espécies, mas geralmente não ultrapassa 1mm. Sua transparência depende da ausência de vasos, ausência de pigmento, que seu epitélio superior não esteja queratinizado e depende da organização das camadas do estroma. Os nutrientes para suas células difundem-se na substância própria a partir de vasos no limbo ou são levados às suas superfícies pelo líquido lacrimal e pelo humor aquoso. A sua superfície é bastante sensível devido à presença de terminações nervosas livres próximas ao epitélio anterior. Estas terminações emergem dos nervos ciliares longos, ramos do nervo oftálmico. Seus axônios formam o ramo aferente do reflexo corneal, que cerra as pálpebras quando a córnea é tocada (MAWAS, 1951).

O endotélio corneano é formado por uma camada simples de células achatadas alinhadas na superfície interna da córnea. Existem controvérsias quanto à capacidade de regeneração dessa camada, podendo variar com a espécie e idade. Em geral em animais jovens são encontradas atividades

mitóticas para este epitélio. A microscopia especular e a microscopia eletrônica de varredura revelaram que essas células tem forma hexagonal e na sua superfície são encontrados microvilosidades e poros (LAING et al., 1976) e suas extremidades laterais são caracterizadas por interdigitações de uma célula sobre outra. Em alguns animais jovens como cães, as células não tem uma forma típica hexagonal, a razão deste pleomorfismo ainda é desconhecido, mas esse arranjo celular pode ser resultante do aumento da atividade mitótica em resposta ao crescimento corneal durante o desenvolvimento do animal. Embora a córnea tenha 75 -85% de água no seu interior ela é relativamente desidrata em comparação com outros tecidos. Esse estado de desidratação é denominado de turgescência, e é em parte uma função do epitélio e principalmente do endotélio que deslocam água do interior do estroma através de bombas de sódio e potássio dependentes de energia (ATPase) (SLATTER, 1998).

MEIOS DE PRESERVAÇÃO DA CÓRNEA

Há mais de duzentos anos na França, Pellier de Quengsi fez o primeiro trabalho de recuperação de visão de um paciente, trocando a córnea opaca por um tecido doador transparente. Posteriormente estudos realizados em animais mostrou a carência de um material homólogo para conseguir enxertos transparentes (EHLERS, 2000). No início do século XX, Magitot (1912) preservou uma córnea durante duas semanas em soro homólogo hemolisado, mantendo-a temperatura de 5-6° C e realizou enxertos lamelares, considerando o homoenxerto fisiologicamente possível. Em 1937, Filatov introduziu o método de preservação do bulbo ocular em câmara úmida, colocando-os em frascos de vidro, em gelo, a uma temperatura de 4°C de 20 a 56 horas (EHLERS, 2002; JENG, 2006). Apesar da técnica não requerer equipamentos o tempo era curto demais e desta forma os enxertos deveriam ser utilizados quase como em uma emergência e nestes casos, os pacientes ficavam hospitalizados até que aparecesse um tecido doador (EHLERS, 2002). Schaeffer (1963) demonstrou danos irreversíveis nas mitocôndrias após 24 horas e danos irreversíveis as estruturas celulares em 96 horas em câmara úmida. Peña-Carrilo e Polack (1964) realizaram estudos para verificar a precocidade das alterações celulares no endotélio corneano de olhos

armazenado na câmara úmida a 4°C. Estes estudos revelaram que após 16 horas de armazenamento alguns vacúolos estavam presentes no citoplasma celular e esses achados se intensificavam com o aumento do período de armazenamento.

Desenvolvido por McCarey e Kaufman em 1974, foi introduzido o McCarey-Kaufman (MK) meio de conservação (McCAREY e KAUFMAN, 1974; PELS, 1997; ANDREW et al., 1999; NOGUEIRA e VASCONCELOS; WING CHU, 2000; YAMASAKI e INOUÉ, 2001; TRINDADE, 2004; JENG, 2006) proporcionando uma armazenagem de até de 3 a 4 dias do tecido doador a 4°C e com isso permitiu um tempo maior para preparação do paciente fazendo com que a ceratoplastia penetrante deixasse de ser um procedimento considerado de emergência (JENG, 2006). Posteriormente em 1978 houve uma modificação nesta formulação que proporcionou uma estocagem por até mais de quatro dias (ANDREW et al, 1999). Embora tenha sido conseguido este feito, era solicitado pelos bancos de córneas um maior tempo de estocagem, conservação e distribuição das córneas em comparação com a hora do óbito e da cirurgia marcada. Desta forma, foram forçadas as pesquisas que trouxessem as técnicas de preservação que permitem hoje um maior tempo de armazenagem de córneas doadoras (WING CHU, 2000).

O meio K-Sol, elaborado em 1985, trouxe em sua composição os glicosaminoglicanos proporcionando a armazenagem de córneas por mais de duas semanas, tempo este intermediário a uma temperatura de 4°C (KAUFMAN et al., 1985; WILSON e BOURNE, 1989; PELS, 1997; ANDREW et al., 1999; WING CHU, 2000; JENG, 2006). Em final dos anos 80 houve a aparição de um meio similar o Dexsol (ANDREW et al., 1999; JENG, 2006). Foram esses os meios que substituíram praticamente o meio MK (PELLS, 1997). Um híbrido do K-Sol e do Dexsol, o Optisol-GS, foi criado pela necessidade do aperfeiçoamento da preservação de córneas e foi introduzido no mercado no início da década de 90 com novos componentes que ajudam na conservação e sobrevivência das células do endotélio na armazenagem a 4°C. Com a estreptomicina acrescentada, o Optisol-GS em 1998 tornou-se o meio de eleição na época atual, sendo inclusive até hoje o mais utilizado nos EUA e tantos outros países da América Latina (ANDREW et al, 1999; ARNDT

et al., JENG, 2006) e também no Brasil onde é usado em 64% dos bancos de olhos nacionais (PEREIRA et al., 2002).

REFERÊNCIAS

- ALBON, J., TULLO, A. B., AKTAR, S., BOULTON, M. E. Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 10, p. 2887–2893, 2000.
- ALVIM, H. S., DINIZ, C. M., TZELIKIS, P. F. M., GONSALVES, R. M. & MAIA, J. A. C. Técnica para preparação e conservação de olhos de porco para cirurgia experimental. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 627-630, 2003.
- ANDREW, S. E., SAMUELSON, D. A., LEWIS, P. A. & KUBILIS, P. S. Comparison of Optisol-GS and neomycin-polymyxin B-gramicidin ophthalmic solution for corneal storage in the dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, p. 155–161, 1999.
- ANDREW, S. E.; CLIPPINGER, T. L.; BROOKS, D. E.; HELMICK, K. E. Penetrating keratoplasty for treatment of corneal protrusion in a great horned owl (*Bubo virginianus*). **Veterinary Ophthalmology**, v. 5, n. 3, p. 201–205, 2002.
- ARNDT, C., REESE, S. & KÖSTLIN, R. Preservation of canine and feline corneoscleral tissue in Optisol® GS. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, n.3, p. 175– 82, 2001.
- BUSSIERES, M., KROHNE, S. G., STILES, J. & TOWNSEND, W. M. The use of porcine small intestinal submucosa for the repair of full-thickness corneal defects in dogs, cats and horses. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 5, p. 352–359, 2004.
- CHAVES, N. S. T.; BARROS, P. S. M.; EURIDES, D.; MARTINS, A. F.; ARAÚJO, L. F. Ceratoplastia penetrante, xenógena, homovital e experimental de porco (*Sus domesticus*) em cão (*Canis familiaris*) – técnica cirúrgica. **A Hora Veterinária**, v. 128, p. 33–35, 2002.
- EHLERS, N. Corneal banking and grafting. The background to the Danish Eye Bank System, where corneas await their patients. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 80, p. 572–578, 2002.
- GABRIC, N., DEKARIS, I., SUMANA, L., KARAMAN, Z. & MRAVICIC, I. The influence of tissue culture on corneal immunogenicity. **Experimental Eye Research**, v. 68, p. 277–282, 1999.
- GAIN, P., THURET, G., CHIQUET, C., VAUTRIN, A-C., CARRICAJÓ, A., ACQUART, S., MAUGERY, J. & AUBERT, G. Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media. **British Journal of Ophthalmology**, v. 85, p. 1158–1162, 2001.

GEORGE, A. J. T.; LARKIN, D. F. P. Corneal transplantation: the forgotten graft. **American Journal of Transplantation**, v. 4, p. 678–685, 2004.

GILGER, B. C. & WHITLEY, R. D. Surgery of the Canine Cornea and Sclera. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 3a ed., Cap. 20, p. 675–700, 1998.

JENG, B. H. Preserving the cornea: corneal storage media. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 17, p. 332–337, 2006.

KAUFMAN, H. E., VARNELL E. D., KAUFMAN S., BEUERMAN R. W., BARRON, B.A. K-Sol corneal preservation. **American Journal of Ophthalmology**, v. 100, n. 2, p. 299–304, 1985.

LANG, R.A. et al. Changes in the corneal endothelium as a function of age. **Experimental eye Research**. Vol. 22, p. 587-594, 1976.

MAGITOT, A. Transplantation of the human cornea previously preserved in an aseptic fluid. *JAMA*, v.59, p.18, 1912.

MAWAS, J. The innervation of the human cornea. **Bulletin of Society Ophthalmology France**, vol. 2, p. 162-168, 1951.

McCAREY, B. E. & KAUFMAN, H. E. Improved corneal storage. **Investigative Ophthalmology**, v. 13, p. 165–173, 1974.

MOLLER-PEDERSEN, T., HARTMANN, U., MOLLER, H. J., EHLERS, N., ENGELMANN, K. Evaluation of potential organ culture media for eye banking using human donor corneas. **British Journal of Ophthalmology**, v. 85, p. 1075–1079, 2001.

NOGUEIRA, R. D. M. & VASCONCELOS, P. R. L. Água de coco como meio de cultura em conservante de córnea: estudo experimental em coelhos. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 59, n. 6, p. 395– 401, 2000.

PELS, L. Organ culture: the method of choice for preservation of human donor corneas. **British Journal Ophthalmology**, v. 81, p. 523–525, 1997.

PEÑA-CARRILO, J.; POLACK, F. M. Histochemical changes in endothelium of corneas stored in moist chambers. **Arch. Ophthalmol.**, v.72, p.811, 1964.

PEREIRA, M. L. M.; SANTOS, A. M. C.; PASSOS, M. C.; PECEGO, J. G. Análise comparativa entre os bancos de olhos brasileiros: da preservação à distribuição da córnea doada. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 61, n. 3, p. 169–172, 2002

SCHAEFFER, E. M. Ultrastructural changes in moist chamber corneas. *Invest. Ophthal.*, v.2, p.272, 1963.

SLATTER, D. & HAKANSON, N. Córnea e Esclerótica. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais** São Paulo: Manole, 2^a ed., v. 2, p. 1436 – 1461, 1998.

THIEL, M. A.; COSTER, D. J.; WILLIAMS, K. A. The potential of antibody-based immunosuppressive agents for corneal transplantation. **Immunology and Cell Biology**, v. 81, p. 93–105, 2003.

TRINDADE, F. C. Transplante de Córnea. In: PEREIRA, W. A. **Manual de Transplante de Órgãos e Tecidos**. São Paulo: Guanabara Koogan - MEDSI, 3a ed., Cap. 18, p. 473–481, 2004.

WILSON, S. E., BOURNE, W. M. Corneal preservation. *Survey of Ophthalmology*, v. 33, p. 237–59, 1989.

WING CHU. The past twenty-five years in eye banking. **Córnea**, v. 19, p. 754–765, 2000.

CAPITULO II

Artigo científico a ser enviado à revista

Título:

Uso do meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) como conservante de córneas de camundongo Swiss.

Fernando José Xavier de Lira ¹, Fabrício B. Sá ²

¹Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil;

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

Endereço para correspondência: Fabrício Bezerra de Sá

e-mail: crleucas@yahoo.com Fone: +55 81 3320 6348

Resumo

As células do endotélio corneal apresentam a importante função de bomba e barreira, mantendo assim a córnea transparente.. Portanto, o propósito deste estudo foi investigar o meio de cultura de tecidos RPMI como forma de preservação de córneas de camundongos mantidas sob refrigeração. Imediatamente após a retirada do meio de preservação, as córneas foram processadas para microscopia de luz e eletrônica de varredura para análise da integridade e forma da célula endotelial. As córneas tornaram-se inviáveis a partir do dia 4 de conservação, apresentando alterações morfológicas, sinais de morte celular e espessura estromal aumentada, indicando edema importante. Concluiu-se que o meio RPMI não é viável pra conservação de córneas com a finalidade de ceratoplastia penetrante, embora, acreditamos que por se manter estéril poderá ser usado para enxertos lamelares.

Palavras-chave: endotélio corneal, preservação de córnea, meios de cultura.

Abstract

An important function of corneal endothelial cells is to provide barrier and pump to maintain tissue transparency. Therefore the purpose of this study was to investigate the RPMI tissue culture medium for mouse cornea preservation kept under refrigeration. In order to evaluate endothelium cells integrity and shape, corneas were processed, immediately after removal from medium, for light and scanning electron microscopy. Corneas became unavailable as of day 4 of storage, exhibiting morphological alterations, with cellular death characteristics and increased stromal thickness, indicating severe edema. It was concluded that RPMI medium is not viable to preserve corneas for penetrating keratoplasty, nevertheless, we believe that it may be used as a preservation medium for corneal lamellar grafts because it is maintained sterile.

Key words: corneal endothelial, corneal preservation, culture medium.

INTRODUÇÃO

A principal função do endotélio corneal é oferecer uma barreira para que a córnea mantenha a sua transparência. Estas funções são atingidas graças às junções aderentes e bombas especializadas que impedem o edema estromal. Como a célula endotelial tem uma reduzida capacidade de proliferação, qualquer enfermidade ou trauma que a danifique irá induzir um alongamento compensatório das células remanescentes, podendo inclusive estar associado à disfunção celular (LANG, 1976).

A hipotermia e os meios de cultura de tecidos são atualmente as duas abordagens principais para conservação de córneas. A conservação por hipotermia consiste em manter as córneas em temperatura entre 2 -6° C em meios disponíveis comercialmente e comumente usados tais como Optisol GS[®] que contem, além dos nutrientes, substâncias osmoticamente ativas como dextrana e sulfato de condroitina garantindo a manutenção da espessura e transparência da córnea, através de uma redução do metabolismo tecidual e preservação da condição fisiológica original por longos períodos. A preservação em meio Optisol GS[®] permite o armazenamento por cerca de 14 a 16 dias, embora ocorra degeneração endotelial. Na realidade o tempo médio de estocagem para transplante é de quatro dias (LINDSTROM et al., 1992; WILHELMUS et al., 1995).

Meios de cultura de tecidos são usados para preservação de córnea principalmente na Europa. Esta abordagem consiste em manter o tecido num meio de cultura suplementado com soro fetal bovino, antibióticos, e antimicóticos em uma temperatura de 31 a 37°C. O propósito destes meios é o de manter o metabolismo e viabilidade o mais semelhante possível às condições fisiológicas. Nestas condições a córnea poderá ser preservada por até 35 dias, porém o método é tecnicamente mais difícil, requerendo cuidados com controle de contaminação e a necessidade de um tempo antes do transplante para desidratação corneal para o restabelecimento da condição original. (HE et al. 2011) Ceratoplastia penetrante representam as cirurgias de

transplante mais empregadas mundialmente na medicina humana. Os custos dos meios de conservação industrializados ainda são elevados, principalmente em nossa região (NOGUEIRA e VASCONCELOS, 2000), e na medicina veterinária. Com isso, ressalta-se a necessidade de novos estudos com meios de preservação de baixo custo e eficientes para que as terapias com transplantes ou enxertos se tornem viável e rotineira na oftalmologia veterinária. O propósito deste estudo foi investigar o meio de cultura de tecidos RPMI como forma de preservação de córneas de camundongos mantidas sob refrigeração e avaliadas por microscopias óptica e eletrônica de varredura.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados camundongos albinos (SWISS) machos com 45 dias de idade provenientes do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do Ministério da Agricultura em Recife-PE, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em ambiente com temperatura e umidade controladas sob regime de iluminação cíclica (12 h escuro, 12 h claro) com intensidade de luz ≤ 100 LUX, em nossa instituição até a execução deste trabalho. Todos os experimentos animais foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco e com o Estatuto para o Uso de Animais em Pesquisa Oftálmica e Visão da ARVO.

COLETA E PROCESSAMENTO DAS CÓRNEAS

Os animais foram divididos em dois grupos, um com córneas a serem mantidas em meio RPMI (n=5) e outro, servindo como controle (n=5) com córneas preservadas em meio comercial padrão Optisol GS[®]. Para cada animal foi estabelecido que apenas uma córnea (esquerda) seria utilizada no protocolo experimental, ficando as córneas direitas como padrão e controle de integridade estrutural para ambos os grupos. Os camundongos foram profundamente anestesiados com Quetamina (100mg/Kg- Vetencol[®]) e

Xilazina (20mg/Kg-Rompun®) e submetidos à eutanásia com uma sobre dose de pentobarbital sódico aplicados por via intraperitoneal.

Após a eutanásia, foi procedido um exame oftálmico *post mortem*, com o auxílio de um oftalmoscópio direto (Heine®), para avaliação do segmento anterior do globo e superfície ocular. Animais com qualquer sinal de afecções oculares ou sistêmicas foram descartados do estudo. Após o exame oftálmico, foi instilada uma gota de colírio contendo metilcelulose a 2% em cada olho para se evitar o ressecamento da córnea. Os olhos foram removidos por meio de enucleação transconjuntival. O anel córneo-escleral foi dissecado de maneira asséptica, incidindo a esclera aproximadamente a 1-2 mm do limbo, utilizando lâmina de bisturi nº 15 e lavado com solução de ringer lactato estéril para remover qualquer pequena partícula originada do corpo ciliar e da íris. Foram armazenados em tubos *falcon* transparentes de 14 mL, contendo o meio RPMI (Sigma-Aldrich), mantidos a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ para análise nos dias 4 e 7 de conservação. Como verificação de contaminação bacteriana, foram colhidas amostras com o uso de swabs nos mesmos intervalos de tempo já definidos para análises.

Imediatamente após a retirada do meio de preservação, as córneas foram fixadas em paraformaldeído a 4% em Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,4) por 72 horas, desidratadas em concentrações crescentes alcoólicas e embebidos em Paraplast (Paraplast Plus, Sigma-Aldrich). Foram feitos cortes de $5\mu\text{m}$ de espessura para processamento histológico, corados com Hematoxilina e Eosina para observação em microscópio de luz (Olympus BX-41®) e captura de imagem com câmera fotográfica (Canon Powershot A470) acoplada à lente ocular do aparelho. Foram feitos ajustes de cor, brilho e contrastes nas imagens obtidas e posterior análise morfométrica com o programa computacional Image J® (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Para análise da integridade e forma da célula endotelial, foram utilizadas três córneas, sendo uma de cada grupo de conservação, selecionadas aleatoriamente, e outra (córnea direita, controle) obtida imediatamente após a eutanásia. Todas foram separadamente fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato e encaminhadas ao Aggeu

Magalhães onde foram metalizadas e fotodocumentadas em microscópio eletrônico de varredura.

Os critérios adotados para avaliação histológica das córneas incluíram a presença de necrose, vacuolizações e núcleos em picnose no epitélio e endotélio, espessura total da córnea, assim como as alterações estruturais das fibras estromais. As imagens ultraestruturais foram avaliadas quanto à forma e integridade das células endotélias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O avanço de técnicas cirúrgicas, medicamentos, instrumentais e meios de conservação contribuiu com o alto grau de sucesso dos transplantes de córnea (PELS, 1997). Para realização dos transplantes, no entanto, se faz necessário um grande número de córneas a serem avaliadas. Por isso, estudos visando a melhoria da preservação de córneas são realizados. Segundo Pels (1997) e Andrew et al. (1999), um meio de conservação ideal tanto para animais como para o homem ainda precisa ser formulado.

O Optisol-GS[®] é o meio de conservação mais utilizado em vários países, incluindo o Brasil (WING CHU, 2000; PEREIRA et al., 2002; JENG, 2006). Entretanto, devido ao custo elevado deste produto, e a necessidade de importação do mesmo, foi avaliado neste estudo os efeitos do meio de cultura de tecidos RPMI (Sigma-Aldrich), comercialmente disponível no Brasil, de baixo custo e já consagrado como meio de cultivo para células. Outra vantagem do RPMI é que ele já contém antibióticos como penicilina, estreptomicina e antimicóticos como anfotericina B, em sua formulação.

A endoftalmite é uma séria complicação da ceratoplastia penetrante (HASSAN e WILHELMUS, 2005; ZANETTI et al., 2005; WILHELMUS e HASSAN, 2007). A infecção pode ser causada pela contaminação pré-operatória da córnea doadora, condições inadequadas de assepsia durante a cirurgia e fatores ligados aos pacientes que recebem as córneas (EVERTS et al., 2001; REHANY et al., 2004). Apesar da transmissão esporádica de bactérias e fungos aos receptores de córnea, se tem demonstrado que os

micro-organismos causadores de endoftalmite geralmente derivam das córneas doadoras (WING CHU, 2000; EVERTS et al., 2001; ZANETTI et al., 2005; WILHELMUS e HASSAN, 2007), repercutindo de maneira negativa e grave na visão do receptor (WING CHU, 2000). Os Cocos gram-positivos são os contaminantes mais identificados nos tecidos corneais utilizados para transplante e são responsáveis pelos casos de endoftalmite pós-operatória (KAPUR et al., 2006).

Em todas as amostras deste estudo, apenas uma apresentou contaminação por *Staphylococcus* sp. Por se tratar de um agente comumente encontrado em pele, acreditamos que ocorreu uma falha durante o processo de coleta e envio ao laboratório nesta amostra.

Os resultados mostram que a coloração empregada neste estudo, a HE, foi satisfatória permitindo a revelação de todas as estruturas relevantes da morfologia da córnea (Fig. 1). Nos dados apresentados por Prinsen et al (2011) os autores ressaltam a importância de uma adequada coloração, destacando o HE e o PAS como as melhores.

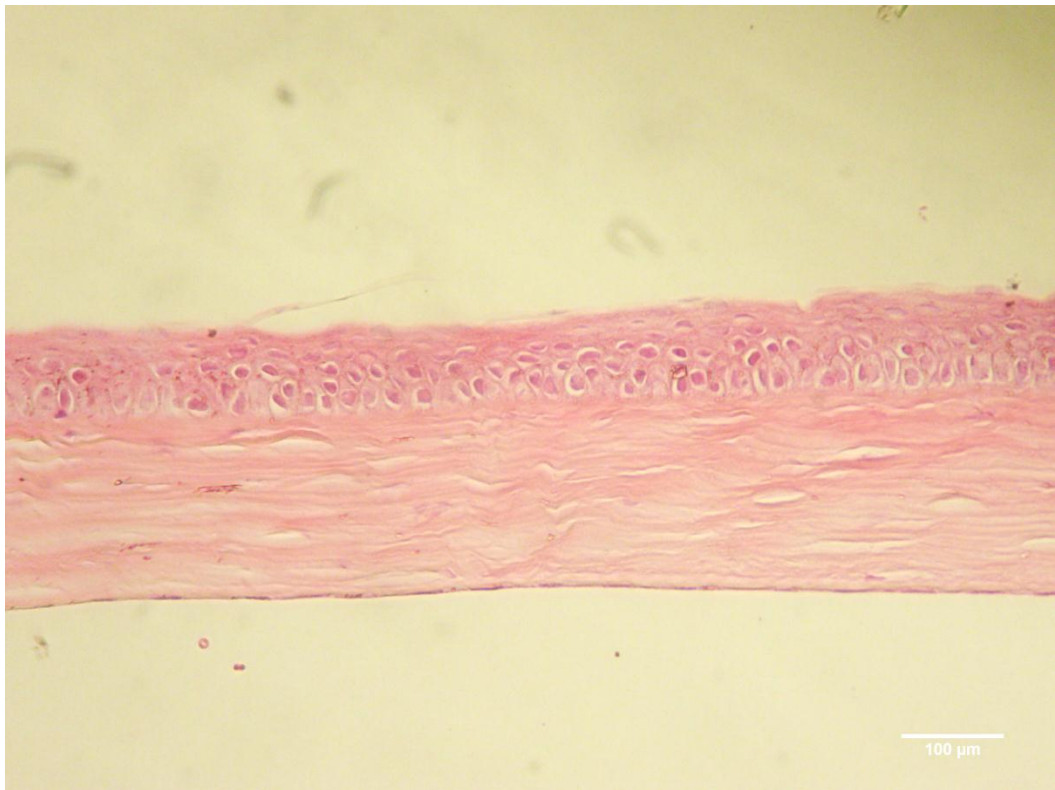


Figura 1. Fotomicrografia da córnea controle de camundongo em corte transversal corada em H.E.

Em ambos os grupos, no quarto dia, o epitélio corneal manteve-se aderido ao estroma anterior. Porém o grupo preservado em RPMI apresentou extensas alterações intra e extracelulares como degeneração hidrópica, edema e picnose nuclear. Isto nos leva a crer que a ausência de agentes hiperosmóticos como o dextran e o sulfato de condroitina A, importante na adesão celular, tenha provocado tais alterações (GORDON et al., 1984). Quando comparado aos resultados do meio comercial Optisol GS, apenas a camada mais superficial do epitélio, formada por células escamosas apresentava-se irregular e com perdas de células (Fig. 2). Estudos têm demonstrado que a baixa temperatura produz mudanças funcionais nos tecidos, principalmente nos complexos juncionais como consequência da depleção do ATP causando dissociação das junções intercelulares (MANDEL et al. 1993; KOMURO, 1999).

Nos últimos anos os estudos mostraram que a parte mais anterior da córnea pode ser utilizada para enxertos lamelares nas correções de ulcerações e a perda da camada mais externa do epitélio, as células escamosas, não alteram os resultados (CHEN, 2010).

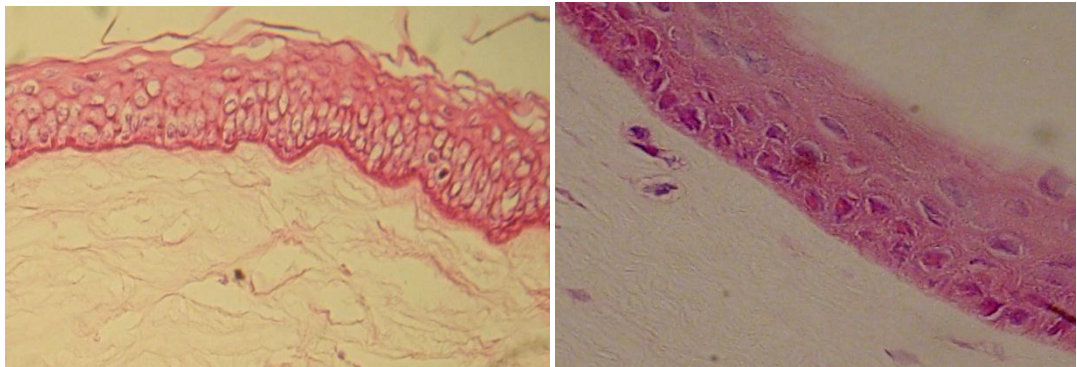


Figura 2. Fotomicrografia da córnea de camundongo em corte transversal corada em H.E. mantidas em conservante por 4 dias em RPMI (A) e Optisol GS (B). Em A evidencia-se grandes alterações no epitélio como perda da camada escamosa, vacuolizações intra e extracelulares, com mudanças estruturais no estroma adjacente. Em B há apenas um despreendimento da camada escamosa.

No sétimo dia, ambas as córneas apresentaram mudanças estruturais como um aumento em sua espessura total (fig. 3 e fig. 4), desorganização do colágeno, rupturas celulares e destruição do epitélio e endotélio. No grupo do Optisol GS®, como esperado, a córnea ainda mantém sua forma.

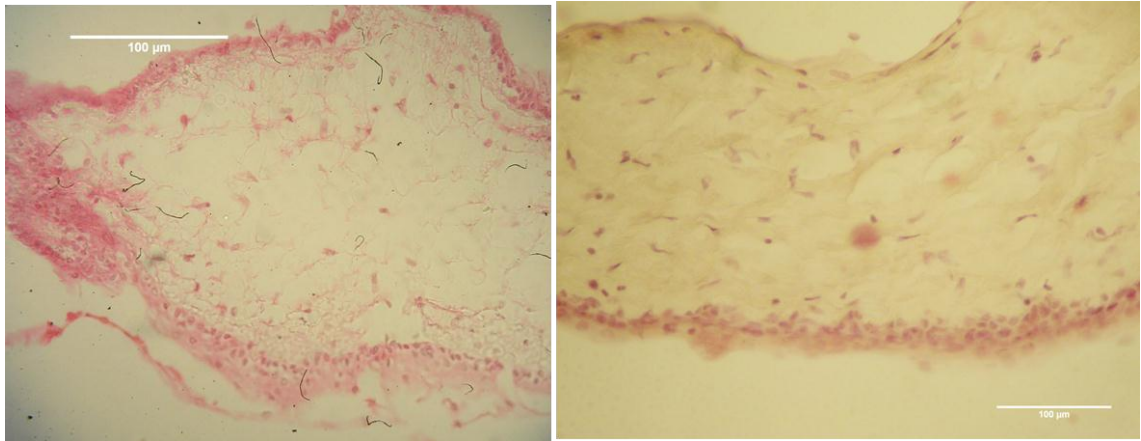


Figura 3. Fotomicrografia da córnea de camundongo em corte transversal corada em H.E. mantidas em conservante por 7 dias em RPMI (A) e Optisol GS® (B). Em A, observa-se uma desorganização estrutural e completa alteração da forma padrão corneal, ainda preservada em B.

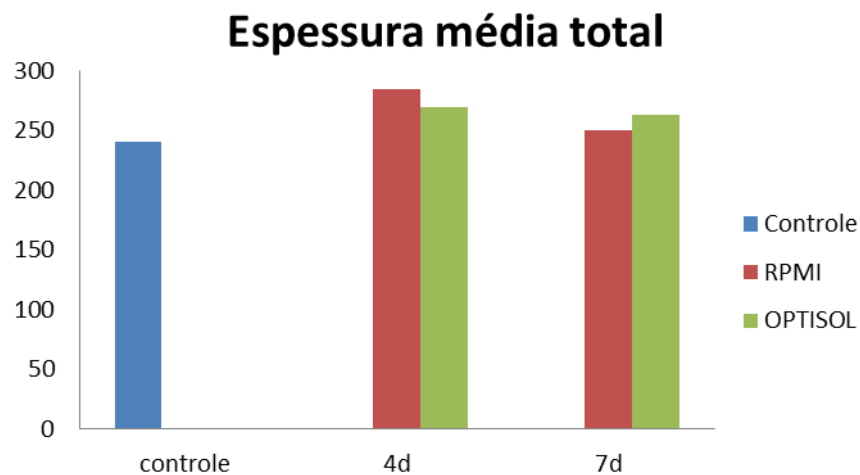


Figura 4. Espessura em micrometros e diferentes intervalos de tempo nas quais as corneas foram mantidas nos meios RPMI e Optisol GS®.

As mudanças estruturais e possivelmente funcionais encontradas nas córneas são resultantes da perda de integridade da bomba endotelial. Rauen et al. (2006) demonstraram que o endotélio é muito sensível a baixas temperaturas e que, em meios líquidos à 4°C, pode ocorrer a formação de radicais livres (dependentes de ferro), induzindo assim a apoptose celular. Meisler et al. (2004) demonstraram que há formação óxido nítrico em meios de preservação de córneas, onde estes também atuam como radicais livres, prejudicando a integridade celular. Estes podem ser fatores que tornaram as córneas inviáveis após preservação no meio testado, provavelmente devido ao meio não apresentar concentrações satisfatórias de substâncias antioxidantes.

Nossos resultados mostraram que aos quatro dias e mantidas em RPMI, a camada endotelial apresentava perdas de células e deformação do

estroma subjacente (fig.5). A microscopia eletrônica pode revelar não só a perda das células, mas também a mudança de sua forma (pleomorfismo), alongamento (polimegatismo), aumento da porosidade em suas paredes e destruição de grande parte de suas vilosidades ou projeções polipodais (Fig. 6, 7).

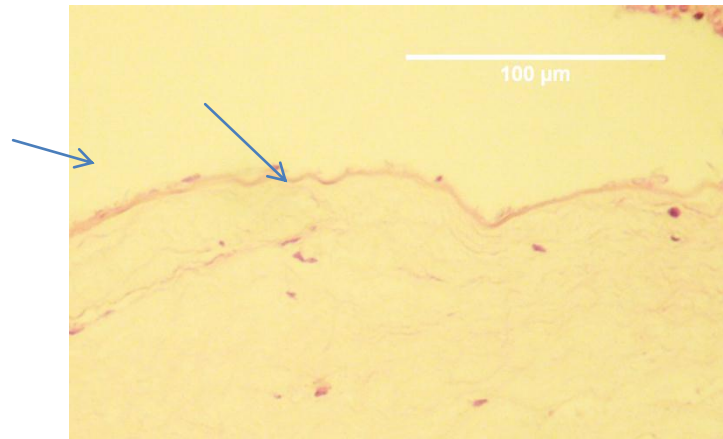


Figura 5. Córnea de camundongo em corte transversal, corada em H.E. após quatro dias em RPMI, evidenciando a perda das células endoteliais (seta).

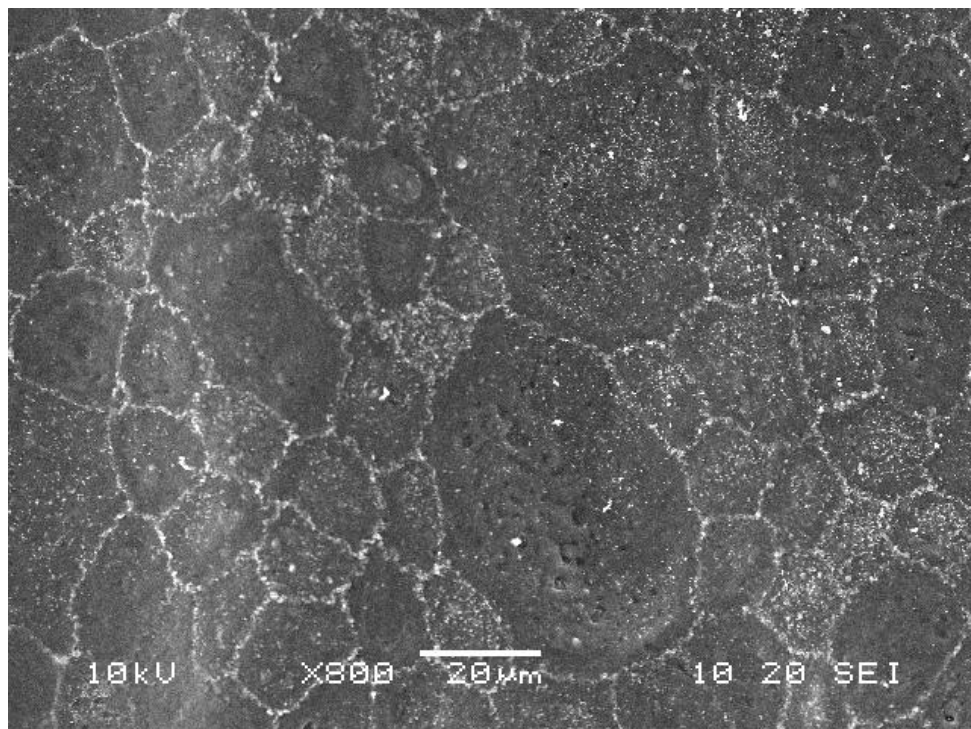


Figura 6. Eletromicrografia de varredura do endotélio corneal de camundongo mantido por 4 dias em meio RPMI. Evidenciam-se células de padrão irregular quanto ao tamanho e projeções na região de junção.

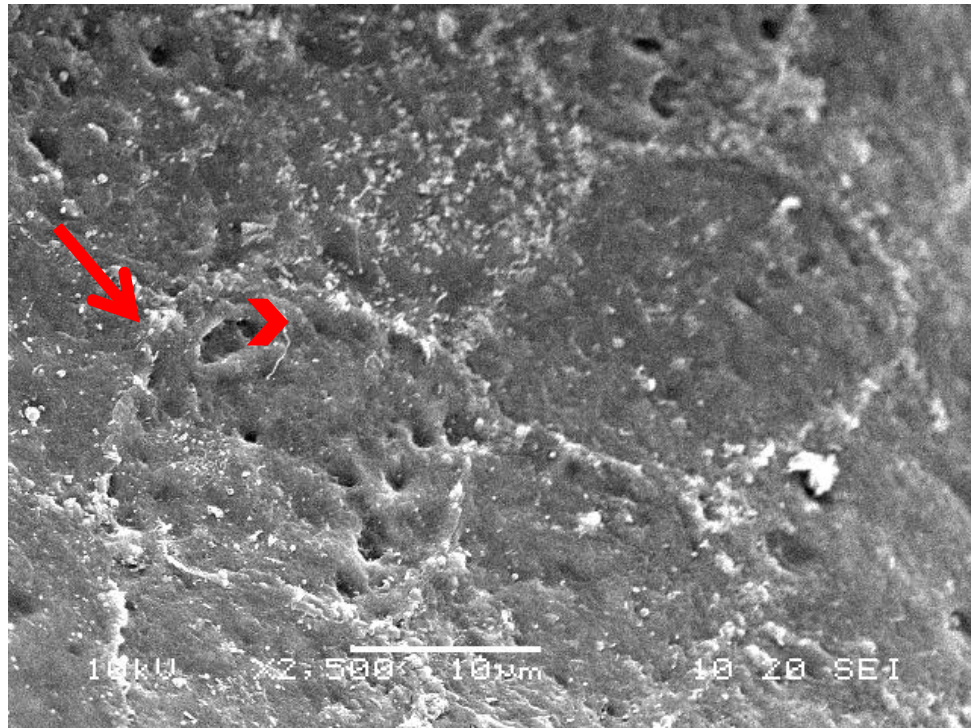


Figura 7. Eletromicrografia de varredura do endotélio corneal de camundongo mantida por 4 dias em meio RPMI. Evidenciam-se sinais de destruição celular como aumento de sua porosidade (seta), alongamento de suas projeções polipodais (cabeça de seta).

Embora as córneas mantidas em RPMI tenham apresentado uma quase completa descélularização tornando-as inadequadas para o transplante total ou ceratoplastia penetrante, estudos recentes tem demonstrado que córneas descélularizadas têm bons resultados, uma vez não há ativação imunogênica do receptor, além de, segundo especulação dos autores, os enxertos corneais intralamelares feitos com apenas matriz extracelular tem o poder de ativar a diferenciação e migração de células troncos residentes no limbo promovendo a regeneração da lesão (HASHIMOTO et al. , 2010)

REFERÊNCIAS

ANDREW, S. E., SAMUELSON, D. A., LEWIS, P. A. & KUBILIS, P. S. Comparison of Optisol-GS and neomycin-polymyxin B-gramicidin ophthalmic solution for corneal storage in the dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, p. 155–161, 1999.

CHEN W, LIN Y, ZHANG X, et al. Comparison of fresh corneal tissue versus glycerin-cryopreserved corneal tissue in deep anterior lamellar keratoplasty. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v. 51, p.775–781. 2010.

EVERTS, R. J.; FOWLER, W. C.; CHANG, D. H.; RELLER, L. B. Corneoscleral rim cultures - lack of utility and implications for clinical decision-making and infection prevention in the care of patients undergoing corneal transplantation. **Cornea**, v. 20, n. 6, p. 586–589, 2001.

GORDON, P. B.; JENKINS, C. S.; HATCHER, V. B. The effect of extracellular matrix in the detachment of human endothelial cells. **J. Cell Physiol.**, v.121, p.467, 1984.

HASHIMOTO, Y.; FUNAMOTO, S; SASAKI, S; HONDA, T.; HATTORI, S.; NAM, K.; KIMURA, T.;MOCHIZUKI, M; FUJISATO, T.; KOBAYASHI, H.; KISHIDA, A.Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. **Biomaterials**. v. 31, p. 3941–3948. 2010.

HASSAN, S. S.; WILHELMUS, K. R. Eye-banking risk factors for fungal endophthalmitis compared with bacterial endophthalmitis after corneal transplantation. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, n. 4, p. 685–690, 2005.

HE, J.; KAKAZU, A. H.; BAZAN, N.G.; BAZAN, H.E.P. Aspirin-Triggered Lipoxin A4 (15-epi-LXA4) Increases the Endothelial Viability of Human Corneas Storage in Optisol-GS. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics** Vol. 27, 3, 2011

JENG, B. H. Preserving the cornea: corneal storage media. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 17, p. 332–337, 2006.

KAPUR, R.; TU, E. Y.; PENDLAND, S. L.; FISCELLE, R.; SUGAR, J. The effect of temperature on the antimicrobial activity of Optisol-GS. **Cornea**, v. 25, p. 319–324, 2006.

KOMURO, A., HODGE, D. O., GORES, G. J., BOURNE, W. M. Cell death during corneal storage at 4° C. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, p. 2827–2832, 1999.

LANG, R.A. et al. Changes in the corneal endothelium as a function of age. **Experimental eye Research**. Vol. 22, p. 587-594, 1976.

LINDSTROM, R.L., KAUFMAN, H.E., SKELNIK, D.L., et al. Optisol corneal storage medium. **Am. J. Ophthalmol.** 114:345–356,1992.

MANDEL L.J.; BACALLAO R.; ZAMPIGHI G. Uncoupling of the molecular‘fence’ and Para cellular ‘gate’ functions in epithelial tight junctions. **Nature.**; v.3, p.552–555,1993

MEISLER, D. M.; KOECK, T.; CONNOR, J. T.; AULAK, K. S.; JENG, B. H., HOLLYFIELD, J. G.; STUEHR, D. J.; SCHADRACH, K. G. Inhibition of nitric oxide synthesis in corneas in storage media. **Experimental Eye Research**, v. 78, p. 891–894, 2004.

PELS, L. Organ culture: the method of choice for preservation of human donor corneas. **British Journal Ophthalmology**, v. 81, p. 523–525, 1997.

PEREIRA, M. L. M.; SANTOS, A. M. C.; PASSOS, M. C.; PECEGO, J. G. Análise comparativa entre os bancos de olhos brasileiros: da preservação à distribuição da córnea doada. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 61, n. 3, p. 169–172, 2002.

PRINSEN, M.K.; SCHIPPER, M.E.I.; WIJNANDS, M.V.W. Histopathology in the isolated chicken eye test and comparison of different stainings of the cornea **Toxicology in Vitro**. v. 25, p.1475–1479, 2011.

RAUEN, U.; KERKWEG, U.; WUSTEMAN, M. C. Cold-induced injury to porcine corneal endothelial cells and its mediation by chelatable iron – implications for corneal preservation. **Cornea**, v. 25, p. 68 – 77, 2006.

REHANY, U.; BALUT, G.; LEFLER, E., RUMELT, S. The prevalence and risk factors for corneal donor button contamination and its association with ocular infection after transplantation. **Cornea**, v. 23, n. 7, p. 649–654, 2004.

WILHELMUS, K. R.; HASSAN, S. S. The prognostic role of donor corneoscleral rim cultures in corneal transplantation. **Ophthalmology**, v. 114, n. 3, p. 440–445, 2007.

WILHELMUS, K.R., STULTING, R.D., SUGAR, J., AND KHAN, M.M. Primary corneal graft failure. A national reporting system. Medical Advisory Board of the Eye Bank Association of America. **Arch. Ophthalmol.** 113:1497–1502, 1995.

WING CHU. The past twenty-five years in eye banking. **Cornea**, v. 19, p. 754–765, 2000.

ZANETTI, E.; BRUNI, A.; MUCIGNAT, G.; CAMPOSAMPIERO, D.; FRIGO, A. C.; PONZIN, D. Bacterial contamination of human organ-cultured corneas. **Cornea**, v. 24, n. 5, p. 603–607, 2005.