

Toxicidade da mitomicina C ao endotélio da córnea de coelhos

Mitomycin C toxicity in rabbit corneal endothelium

Maria Rosa Bet de Moraes Silva¹
Elisa Aparecida Gregório²

RESUMO

Objetivo: Avaliar alterações do endotélio corneano após aplicação de mitomicina C na esclera por meio de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura e correlacionar as alterações com tempo, concentração e entre os dois métodos de avaliação. **Métodos:** Foi avaliado o endotélio corneano dos olhos de 32 coelhos albinos distribuídos em 4 grupos experimentais com 8 coelhos cada um. A mitomicina C foi aplicada sob retalho escleral no olho direito por 5 minutos. Nos grupos G1 e G2 a concentração da mitomicina C foi de 0,5 mg/ml e nos grupos G3 e G4 a concentração foi de 0,2 mg/ml. O exame foi realizado com 15 dias após nos grupos G1 e G3 e com 30 dias nos grupos G2 e G4. Dos 8 animais 4 foram preparados para microscopia eletrônica de transmissão e 4 para microscopia eletrônica de varredura. Os olhos esquerdos de todos animais serviram como controle. **Resultados:** À microscopia eletrônica de transmissão foram observadas alterações do endotélio corneano em todos os grupos experimentais: rarefação do citoplasma, dilatação e fragmentação das cisternas do retículo endoplasmático rugoso, aparelhos de Golgi com dilatação das cisternas, redução de vacúolos e irregularidades da membrana celular interna sendo mais intensas em G1 e G2. À microscopia eletrônica de varredura foram observadas alterações em todos grupos experimentais, exceto G1: alteração de forma e tamanho das células e projeções filopoidais mais longas. **Conclusões:** 1 - A mitomicina C causou alteração no endotélio da córnea tanto na concentração de 0,5 mg/ml como de 0,2 mg/ml observadas 15 e 30 dias após a aplicação; 2 - As alterações foram mais intensas com a maior concentração de mitomicina C (0,5 mg/ml) na microscopia eletrônica de transmissão e não na microscopia eletrônica de varredura; 3 - As alterações tiveram correlação com o tempo na microscopia eletrônica de varredura e não na microscopia eletrônica de transmissão.

Descritores: Endotélio, córnea; Mitomicina/toxicidade; Microscopia eletrônica de transmissão; Microscopia eletrônica de varredura; Humor aquoso/metabolismo; Corpo vítreo; Coelhos

Trabalho realizado no Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP - Botucatu (SP) - Brasil.

¹ Professora Livre-Docente, Adjunta do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista - UNESP - Botucatu (SP) - Brasil.

² Professora Titular do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu (SP) - Brasil.

Endereço para correspondência: Maria Rosa Bet de Moraes Silva. Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e CCP - Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu - SP - CEP 18618-970
E-mail: rosabet@fmb.unesp.br

Recebido para publicação em 03.04.2008
Última versão recebida em 09.02.2009
Aprovação em 17.02.2009

INTRODUÇÃO

A mitomicina C (MMC) é um antibiótico antimetabólico alquilante derivado do *Streptomyces caespitosus* que inibe a síntese de DNA⁽¹⁾ e tem sido amplamente utilizada em oftalmologia, principalmente em cirurgias anti-glaucomas para reduzir a “fibrose” pós-operatória.

A MMC aplicada em superfícies oculares externas como a esclera, pode no entanto penetrar no olho e atingir o humor aquoso⁽²⁻⁷⁾. Estudos mostraram que após aplicação da MMC na esclera foram observadas lesões tóxicas

no corpo ciliar⁽⁸⁻¹⁵⁾. Estas lesões tóxicas observadas no corpo ciliar por meio de estudos morfológicos poderiam explicar complicações que ocorrem no pós-operatório de cirurgias antiglaucomatosas, como a hipotonia⁽⁸⁾.

Uma vez na camada anterior, a MMC poderia causar alterações tóxicas também no endotélio da córnea. Recentemente foi descrita ceratopatia bolhosa adjacente ao local da trabeculectomia com o uso de MMC associada às irregularidades e à necrose de células endoteliais no mesmo local⁽¹⁶⁾.

Apesar da MMC ser muito utilizada em todo o mundo em vários tipos de cirurgias antiglaucomatosas, cirurgias refrativas e outras, há poucos estudos que avaliem suas possíveis alterações na córnea. Os estudos existentes são controversos em relação às alterações e à redução do número de células endoteliais⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Estes estudos diferem, no entanto, quanto ao tempo de observação, métodos de avaliação, formas de aplicação, concentração, uso de irrigação, o que dificulta comparações.

O objetivo deste estudo foi o de avaliar alterações do endotélio corneano de coelhos, após aplicação de MMC na esclera, por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e observar se há correlação das alterações entre os dois métodos, com o tempo e com a concentração.

MÉTODOS

Foi realizado estudo experimental que avaliou o endotélio da córnea por microscopia eletrônica de transmissão e por microscopia eletrônica de varredura de ambos os olhos de 32 coelhos albinos sadios da raça Norfolk, de ambos os sexos. Os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais de 8 coelhos cada um. O grupo 1 (G1) recebeu 0,5 mg/ml de mitomicina C no OD e foi examinado 15 dias após, o grupo 2 (G2) recebeu 0,5 mg/ml de mitomicina C no OD e foi examinado 30 dias após, o grupo 3 (G3) recebeu 0,2 mg/ml de MMC no OD e foi examinado 15 dias após e o grupo 4 (G4) recebeu 0,2 mg/ml de MMC no OD e foi examinado 30 dias após. Os olhos esquerdos (OE) de todos os animais formaram o grupo controle.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP (Protocolo nº 124 CEEA).

Após exame dos olhos dos coelhos com auxílio de microscópio cirúrgico foi feita abertura conjuntival de base fórnice e retalho escleral de aproximadamente 1/2 espessura medindo 4/4 mm de lado, localizado entre os músculos reto superior e reto lateral. A MMC (Mitocin® - Bristol - Meyers Squibb Brasil S/A) foi aplicada nos olhos direitos (OD) sob o retalho, com auxílio de fragmento de algodão estéril que media aproximadamente 4 mm de lado, embebido em 0,1 ml de solução de MMC de diferentes concentrações conforme o grupo. O fragmento de algodão foi aplicado durante período de 5 minutos em todos os grupos. Os olhos esquerdos (OE) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, diferindo apenas quanto à solução que embebia o fragmento de algodão que era

solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9 mg/ml). Após a retirada do fragmento de algodão todos os olhos foram irrigados com 20 ml de solução fisiológica. O retalho escleral foi suturado com 2 pontos separados de mononylon 10-0 nas extremidades do mesmo, e a conjuntiva com 1 ponto conjuntivo-escleral de vicryl 7-0, na extremidade medial da abertura.

Logo após exame clínico dos olhos sob microscópio cirúrgico, os animais foram eutanasiados com dose letal de pentobarbital sódico a 4%. Foi realizada enucleação dos olhos e 4 córneas de cada grupo foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão e 4 córneas de cada grupo para microscopia eletrônica de varredura.

A região da córnea adjacente ao retalho escleral foi processada para MET sendo recortada em fragmentos de 1 mm de lado. Os fragmentos foram fixados por imersão em glutaraldeído a 2,5% no tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3), pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão e incluídos em Araldite. Foram feitos cortes semifinos, que foram corados com azul de toluidina a 1% em solução de bórax a 1% por 15 minutos em platina aquecida. O exame das lâminas assim preparadas permitiu a seleção das áreas para o exame ultraestrutural. O exame à MET foi feito em cortes ultrafinos contrastados com acetato de uranila 0,5% em solução alcoólica 50% e citrato de chumbo.

As córneas processadas para MEV foram seccionadas ao meio e apenas a parte superior (que estava mais próxima do retalho escleral) foi analisada. As córneas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 0,5% em água destilada, desidratadas em série crescente de álcool, secadas em ponto crítico com CO₂ líquido, montadas em "stubs" e metalizadas com 15 nm de ouro.

Foi feita análise qualitativa das elétron-micrografias de forma mascarada. Foram analisados à MET os seguintes componentes celulares: membrana plasmática e junções celulares, retículo endoplasmático rugoso (RER), complexos de Golgi, vacúolos e presença/ausência de rarefação no citoplasma. À MEV foi avaliada a morfologia celular (forma e tamanho comparativo das células) e as projeções filopoidais. Considerou-se o endotélio do grupo controle (OE) como padrão de normalidade.

As alterações observadas à MET e à MEV foram comparadas.

RESULTADOS

A avaliação clínica dos olhos tanto do grupo controle como dos grupos experimentais, realizado imediatamente antes da eutanásia revelou córneas transparentes sem alteração. No entanto, foram observadas alterações morfológicas nos olhos dos grupos experimentais à MET e à MEV que estão resumidas na tabela 1.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Nos olhos do grupo controle (OE) o endotélio apresentou células com citoplasma com grande número de organelas e

Tabela 1. Descrição das alterações observadas no endotélio corneano de coelhos albinos dos quatro grupos experimentais à microscopia eletrônica de transmissão (MET) e à microscopia eletrônica de varredura (MEV)

	MET	MEV
G1	Irregularidade de membrana interna. Rarefação do citoplasma. RER - dilatado e fragmentado. Golgi escasso e menor. Redução vacúolos (próx. Descemet).	Sem alterações
G2	Irregularidade de membrana interna. Rarefação/desorganização do citoplasma. RER - dilatado (pouco) e fragmentado. Golgi - dilatação discreta. Redução vacúolos (próx. Descemet).	Irregularidade de tamanho e forma
G3	Rarefação citoplasma. RER - dilatado (pouco) e fragmentado. Golgi - dilatação discreta.	Projeções filopoidais mais longas
G4	Irregularidade de membrana interna. Rarefação no citoplasma. RER - dilatado e fragmentado.	Irregularidade de tamanho e forma

G1= MMC 0,05 mg/ml - exame após 15 dias; G2= MMC 0,05 mg/ml - exame após 30 dias; G3= MMC 0,02 mg/ml - exame após 15 dias; G4= MMC 0,02 mg/ml - exame após 30 dias

mais denso na parte posterior da célula. As mitocôndrias estavam mais concentradas ao redor do núcleo e o grande número de cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER), concentrado nas laterais das células. Havia grande número de complexos de Golgi bem desenvolvidos e preferencialmente concentrados ao redor do núcleo (Figura 1A). A membrana celular interna apresentava aspecto regular. A membrana celular externa (próxima à membrana de Descemet) apresentava vários vacúolos (Figura 1B).

Todos os olhos dos grupos experimentais (OD) submetidos à aplicação da MMC independente da concentração apresentaram à MET do endotélio corneano: rarefação do citoplasma (Figura 2A), dilatação e fragmentação das cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER) (Figura 2B) e aparelhos de Golgi menores, com dilatação das cisternas, redução de vacúolos próximos à membrana de Descemet e irregularidades da membrana interna. Houve, no entanto, variação de intensidade, sendo as alterações mais intensas em G1 e G2 (0,5 mg/ml) do que nos grupos G3 e G4 (0,2 mg/ml).

Não foi possível observar diferença quanto ao tempo de observação quando foi usada a concentração de 0,5 mg/ml, mas com a concentração de 0,2 mg/ml as alterações foram mais intensas após 30 dias (G4).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

No grupo controle o endotélio apresentou-se constituído por células de formato hexagonal regular e com projeções citoplasmáticas nas regiões de junção. Outras projeções esparsas foram observadas homogeneamente distribuídas na superfície celular (Figura 3).

A MEV dos olhos dos grupos experimentais (OD) revelou alterações em todos os grupos exceto no G1.

Nos olhos examinados após 30 dias da aplicação da MMC (G2 e G4) foram observadas: irregularidades no formato (pleomorfismo) e tamanho das células (polimegatismo) (Figuras 4A e 4B) e nos olhos examinados após 15 dias e submetidos à MMC a 0,2 mg/ml (G3) foram observadas projeções filopoidais mais longas (Figura 4C).

DISCUSSÃO

A MMC utilizada em cirurgias oftalmológicas é sempre aplicada nas superfícies oculares externas. Mas mesmo a MMC aplicada na esclera pode atingir a câmara anterior^(2,4-6) e assim ser tóxica para o endotélio corneano.

Esta potencial toxicidade, poderia causar alterações endoteliais ou agravar alterações endoteliais já existentes decorrentes da idade, do próprio glaucoma ou de patologias associadas⁽¹⁸⁾ que não estavam evidentes, comprometendo assim o resultado das cirurgias. Apesar disso, poucos são os estudos que avaliam a toxicidade da MMC para a córnea. No primeiro trabalho que avaliou a toxicidade da MMC para o endotélio corneano, a MMC (0,5 mg/ml) foi injetada na câmara anterior de olhos humanos e foi observado após 72 horas, opacificação e espessamento da córnea. Ao exame histopatológico realizado após 2 semanas, foi observado ausência total do endotélio e edema corneano⁽²⁰⁾. Nas cirurgias oftalmológicas porém, a concentração de MMC que pode chegar até o humor aquoso é provavelmente muito menor e sofre influência de vários fatores nem sempre padronizados.

A correlação da concentração com a lesão endotelial é controversa na literatura. Estudo com córneas de coelhos albinos perfundidas com MMC em diversas concentrações (0,0005; 0,05; 0,25 e 0,5 mg/ml) observou edema corneano não correlacionado com a concentração⁽²¹⁾. Também foi estudado o efeito da MMC nas concentrações de 0,2, 0,02 e 0,002 mg/ml em cultura de células endoteliais de coelho albino e observou-se após 24 horas, alterações morfológicas tornando-se as células mais "alongadas" e com núcleo mais corado. Estas alterações também não se correlacionaram com a concentração da droga utilizada. No entanto a redução do número de células que ocorreu com todas as concentrações apresentou correlação direta com a maior concentração da droga⁽²²⁾.

No entanto, outros autores⁽²³⁾ estudando córneas humanas, observaram instalação rápida de edema corneano, à MEV, desaparecimento das junções intercelulares com formação de vacúolos transcelulares e à MET, formação de vacúolos com ruptura de organelas correlacionadas com a concentração. As

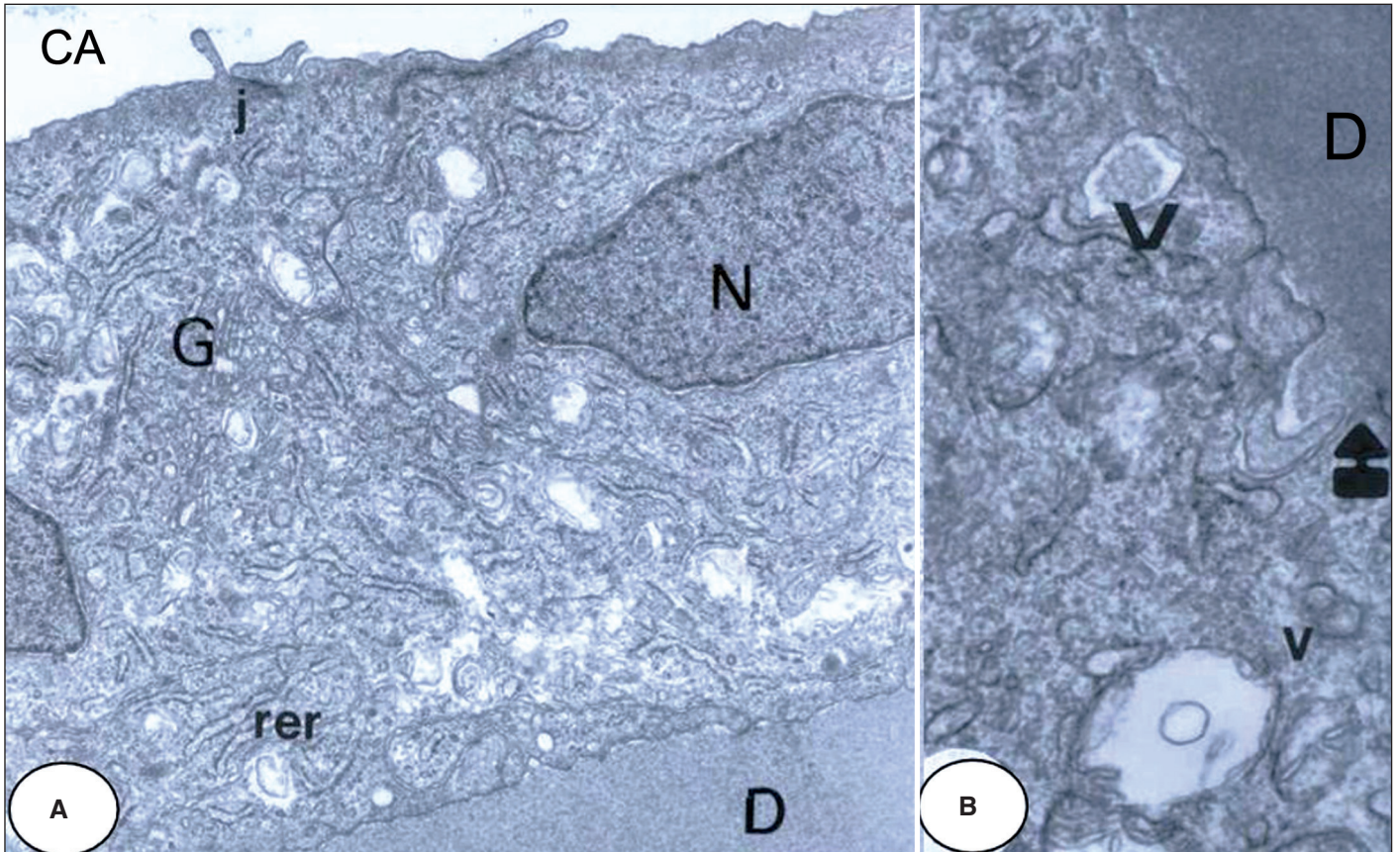


Figura 1 - Células do OE (controle). A: Unidas por complexo juncional (j) na superfície interna voltada para a câmara anterior (CA). Notar retículo endoplasmático rugoso (rer), complexos de Golgi (G) e núcleo frouxo (N). Membrana de Descemet (D). B: Membrana de Descemet (D). Vacúolos citoplasmáticos (v) com material floculado (V) e imagens de fusão de vesículas com liberação de conteúdo (setas). Aumento original X 21.000.

alterações ocorreram após perfusão durante 3 horas, com MMC (200 µg/ml) mas não foram observadas com a concentração de 20 µg/ml. Outro estudo confirmou a correlação das lesões com concentração em córneas humanas isoladas e perfundidas com MMC nas concentrações de 20 e 200 µg/ml, as alterações foram observadas apenas na concentração de 200 µg/ml incluindo instalação de edema rápido e destruição de organelas intracelulares⁽²⁴⁾.

Neste trabalho com padronização de concentração, volume, tempo de aplicação e irrigação foram observadas alterações tanto à MET como à MEV apesar das córneas permanecerem transparentes. Não houve correlação das alterações entre os dois métodos de avaliação, mas os resultados mostraram mais alterações nas células endoteliais quando se utilizou maior concentração de MMC à MET mas não à MEV. Também houve correlação das alterações com o tempo de observação, mas não de forma uniforme, pois a correlação foi mais evidente quando foi usada concentração de 0,2 mg/ml e com a MEV.

Estudos com microscopia especular mostraram redução do número de células endoteliais após trabeculectomias com uso de MMC que variou de 7% a 14,52%^(17,25-27). No único destes estudos com grupo controle, a redução foi significa-

tivamente maior no grupo da trabeculectomia com MMC (14,52%) do que no grupo da trabeculectomia sem MMC (3,73%)⁽¹⁷⁾.

Comparações entre os diversos trabalhos e com este estudo são muito difíceis não apenas porque parte dos trabalhos foi realizada em córneas humanas e outra parte em córneas de animais, mas também por empregarem metodologias bastante diferentes para aplicação da MMC assim como para a avaliação das alterações. Parte dos trabalhos não refere sequer o volume de MMC utilizado, o uso e volume da solução de irrigação e o tipo de veículo utilizado para aplicação.

O único estudo a apresentar resultados com fotos de MEV e MET⁽²³⁾, estudou córneas humanas de banco de olhos e descreveu alterações de organelas semelhantes às que encontramos. Observaram, no entanto formação de grande número de vacúolos com desaparecimento de células que diferem de nossos resultados. Esta diferença pode ser decorrente, além de outros fatores, da agudeza do experimento e da alta dose de mitomicina C (200 µg/ml) que entrou em contato direto com o endotélio por perfusão das córneas. Estudo com córneas humanas "in vitro" perfundidas com MMC (20 µg/ml) e examinadas à MET e MEV só descreve que houve alteração de organelas sem especificá-las⁽²⁴⁾. Outros autores perfundiram córneas humanas e

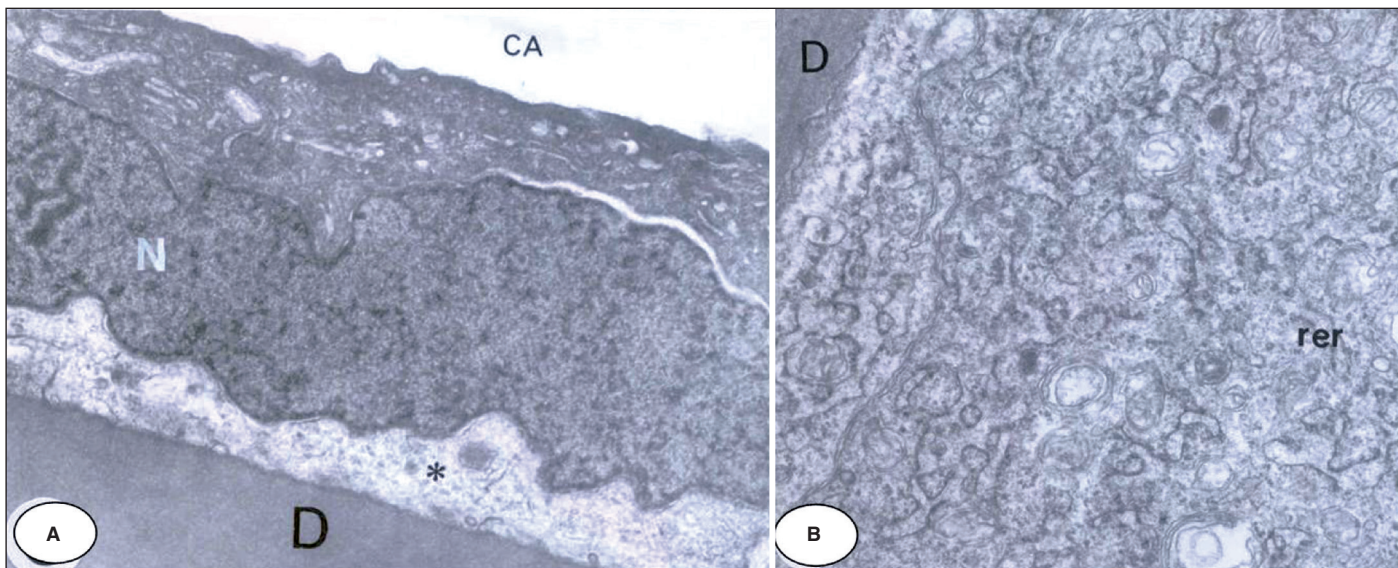


Figura 2 - A: OD de G2. Célula endotelial alterada. * = Observa-se rarefação da parte citoplasmática voltada para a membrana de Descemet (D), câmara anterior (CA), núcleo (N). X 16.500. B: OD de G1 com cisternas de retículo endoplasmático rugoso (rer), tortuosas, dilatadas e fragmentadas e ausência de aparelho de Golgi. Membrana de Descemet (D). X 23.000.

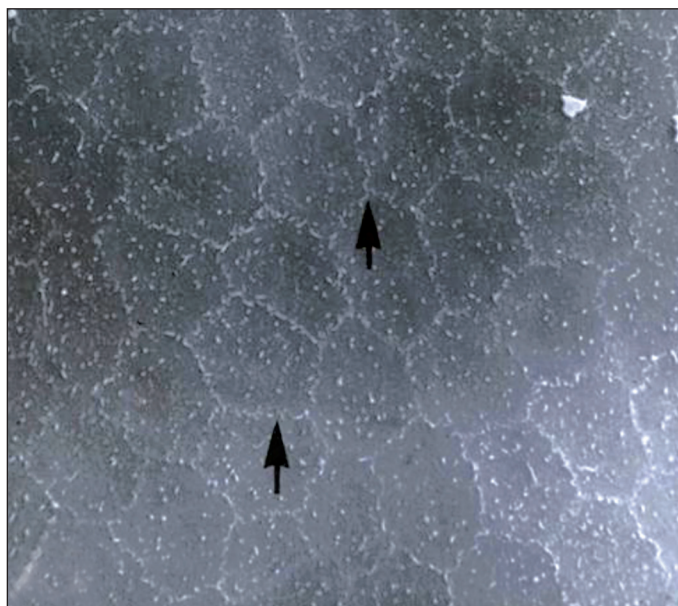


Figura 3 - OE (controle). Células poligonais ou hexagonais de padrão regular, delimitadas por junções entre células formando bordas serrilhadas discretas na superfície celular (setas). X 1.110.

de coelhos albinos com MMC (0,5 mg/ml) durante 10 e 30 minutos e também observaram vacuolização do citoplasma⁽²⁸⁾.

Neste trabalho, e nos citados acima (que não usaram perfusão), não se conhece a quantidade da droga que atingiu o endotélio corneano. Provavelmente foi muito menor do que 200 µg/ml, dose geralmente empregada nos trabalhos de perfusão. Assim mesmo, alterações puderam ser detectadas apesar das córneas terem se mantido transparentes durante o período do experimento. Deve-se ressaltar ainda que, nos trabalhos que a

avaliação endotelial foi realizada por microscopia especular, esta foi feita no centro da córnea, portanto longe do local da cirurgia, provavelmente subestimando as alterações.

O fato das alterações observadas no presente trabalho terem sido em animais jovens e sadios sugere que poderíamos encontrar alterações em maior número e/ou de maior intensidade se os animais fossem velhos e/ou glaucomatosos, condição esta comum na prática clínica.

Outro aspecto a ser considerado é que as alterações descritas têm maior probabilidade de ocorrer quando da perfuração acidental da esclera durante a cirurgia ou em escleras muito finas ou ainda, quando o “turnover” de humor aquoso estiver reduzido como em cirurgias que utilizam viscoelástico, prolongando o tempo de contato da droga com o endotélio. No presente trabalho olhos com perfuração acidental durante a cirurgia foram excluídos.

Apesar da maioria dos estudos clínicos em pacientes submetidos à trabeculectomia com utilização de dose única de MMC no intraoperatório não se referir à toxicidade corneana, este trabalho e os citados acima demonstraram que a toxicidade pode ocorrer. Como a maioria dos estudos foi aguda ou de curto prazo (3 meses), existe a possibilidade de que alterações ou perdas de células endoteliais continuem a longo prazo, particularmente em pacientes que já apresentam baixa contagem no pré-operatório. Assim, mais estudos clínicos bem controlados e com observações de longo prazo se fazem necessários, pois estudos em animais como o coelho podem não estar demonstrando a gravidade das alterações, já que diferentemente do endotélio corneano humano, o do coelho tem grande atividade proliferativa⁽²⁹⁾. Finalmente não se pode descartar a possibilidade de ocorrer efeito tardio cumulativo da MMC⁽³⁰⁾.

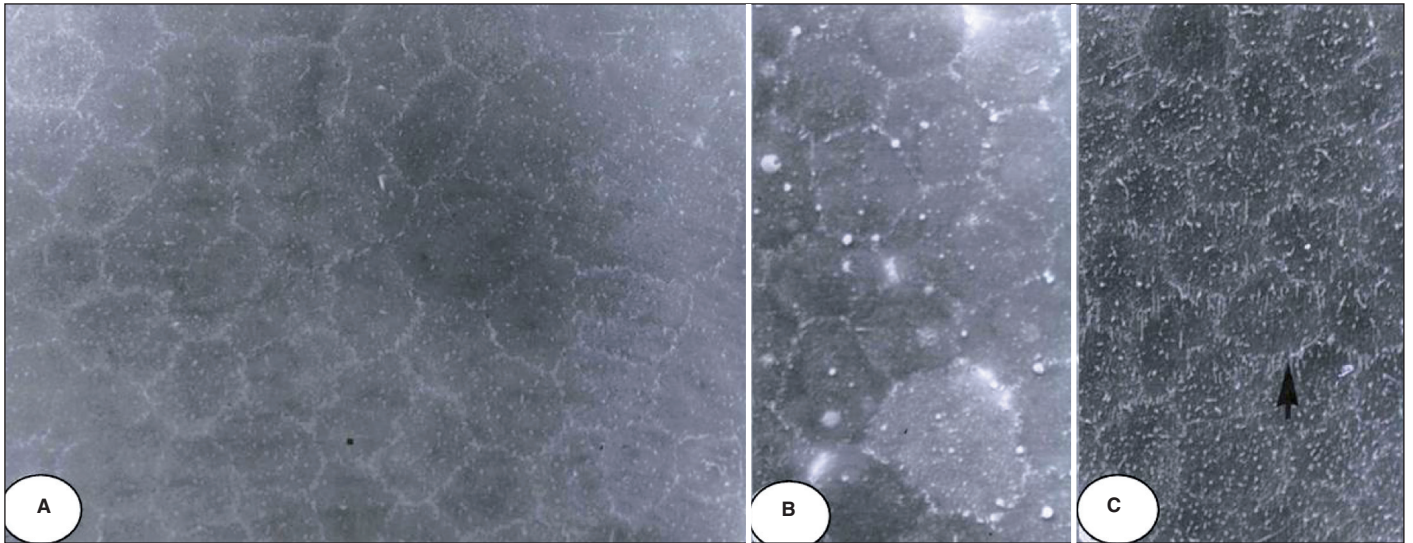


Figura 4 - A: OD de G2. Células de padrão irregular, de tamanhos variados. X 1.155. B: OD de G4 - células de padrão irregular quanto ao tamanho e projeções na região de junção. X 1.110. C: OD de G3 - células de padrão regular, porém com abundantes projeções filopodais alongadas tanto nas regiões de junção celular como na superfície celular (seta). X 1.110.

CONCLUSÕES

1. A MMC causou alterações no endotélio da córnea tanto na concentração de 0,5 mg/ml como de 0,2 mg/ml observadas 15 e 30 dias após a aplicação;
2. As alterações foram mais intensas com a maior concentração de MMC (0,5 mg/ml) na MET e não na MEV;
3. As alterações tiveram correlação positiva com o tempo na MEV e não na MET.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate corneal endothelium alterations after applying mitomycin C to the sclera using transmission and scanning electron microscopy, correlating alterations with time, concentration, and evaluation methods. **Methods:** The corneal endothelium of both eyes of 32 albino rabbits was evaluated and distributed into four groups of 8. Mitomycin C was applied under a scleral flap in the right eye for 5 minutes. Mitomycin C concentrations were 0.5 mg/ml for G1 and G2 and 0.2 mg/ml for G3 and G4. Examinations were performed 15 days after application to G1 and G3, and 30 days after application to G2 and G4. Four cornea in each group were prepared for transmission electron microscopy and four for scanning electron microscopy. Left eyes of all animals were used as controls. **Results:** Transmission electron microscopy showed corneal endothelium alterations in all groups: rarefied cytoplasm, dilation and fragmentation of rough endoplasmic reticulum cisternae, Golgi apparatus with cisternal dilation, reduced vacuoles, and irregularities of internal membrane more noticeable in G1 and G2. Scanning electron microscopy revealed alterations in all groups except G1: changes in the shape

and size of cells and longer filopodial projections. **Conclusions:** 1 - Corneal endothelium alterations were seen at both 0.5 and 0.2 mg/ml concentrations and at 15 and 30 days after mitomycin C application; 2 - Alterations were more intense with higher mitomycin C concentration by transmission electron but not by scanning electron microscopy; 3 - The alterations correlated with time by scanning electron microscopy but not by transmission electron microscopy.

Keywords: Endothelium, corneal; Mitomycin/toxicity; Microscopy, electron, transmission; Microscopy, electron, scanning; Aqueous humor/metabolism; Vitreous body; Rabbits

REFERÊNCIAS

1. Croke ST, Bradner WT. Mitomycin C: a review. *Cancer Treat Rev.* 1976; 3(3):121-39.
2. Kawase Y, Matsushita H, Yamamoto T, Kitasawa Y. Mitomycin concentration in rabbit and human ocular tissues after topical administration. *Ophthalmology.* 1992;99(2):203-7.
3. Kirchoff B, Diestelhorst M. The effect of mitomycin C on the aqueous humor dynamics in glaucomatous eyes [abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34:815.
4. Sarraf D, Ezzuduemhoi RD, Cheng Q, Wilson MR, Lee DA. Aqueous and vitreous concentration of mitomycin C by topical administration after glaucoma filtration surgery in rabbits. *Ophthalmology.* 1993;100(10):1574-9.
5. Seah SK, Prata JA Jr, Minckler DS, Koda RT, Baerveldt G, Lee PP, et al. Mitomycin C concentration in human aqueous humor following trabeculectomy. *Eye.* 1993;7(Pt 5):652-5.
6. Seah SKL, Minckler DS, Prata Jr. JP, Koda RT, Baerveldt G, Hever DK. Mitomycin C level in aqueous humor during trabeculectomy [abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34:815.
7. Machado CG, Susanna Jr R. Effect of irrigation on mitomycin-C concentration and pharmacokinetics parameters in rabbit's eyes. In: Kriegstein GK, editor. *Glaucoma update VI.* New York: Springer; 1999. p.219-21.
8. Mietz H, Addicks K, Diestelhorst M, Kriegstein GK. Extraocular application of mitomycin C in a rabbit model: cytotoxic effects on the ciliary body and epithelium. *Ophthalmic Surg.* 1994;25(4):240-4. Comment in: *Ophthalmic Surg.* 1995;26(2):166-7.

9. Mietz H, Addicks K, Bloch W, Krieglstein GK. Long-term intraocular toxic effects of topical mitomycin C in rabbits. *J Glaucoma*. 1996;5(5):325-33.
10. Moraes-Silva MRB, Gregório EA. Efeito da mitomicina C no epitélio ciliar. Estudo experimental em coelhos com microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. *Rev Bras Oftalmol*. 2006;65(1):18-27.
11. Hamada A, Moraes-Silva MRB, Gregório EA. Avaliação ultra-estrutural dos efeitos tóxicos da mitomicina C no epitélio ciliar de olhos de coelhos normais com e sem tratamento hipotensor ocular prévio. *Arq Bras Oftalmol*. 2007;70(4):657-66.
12. Teague BJ, Skuta GL, Mardelli PG, Shaver RP, Nordquist RE. Ciliary body and retinal toxicity after subconjunctival injection of mitomycin C in rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36:90.
13. Heaps RS, Nordlund JR, Gonzalez-Fernandez F, Redick JA, Conway BP. Ultrastructural changes in rabbit ciliary body after extraocular mitomycin C. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:1971-5.
14. Hara T, Obata H, Shirato S, Araie M. [The cytotoxic effect of topical mitomycin C on the ciliary body in rabbits]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 1998;102(2):88-94. Japanese.
15. Schraermeyer V, Diestelhorst M, Bieker A, Theisohn M, Mietz H, Ustundag C, et al. Morphologic proof of the toxicity of mitomycin C on the ciliary body in relation to different application methods. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1999;237(7):593-600.
16. Mietz H, Roters S, Krieglstein GK. Bullous keratopathy as a complication of trabeculectomy with mitomycin C. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2005;243(12):1284-7.
17. Sihota R, Sharma T, Agarwal HC. Intraoperative mitomycin C and the corneal endothelium. *Acta Ophthalmol Scand*. 1998;76(1):80-2.
18. Fukuchi T, Hayakawa Y, Hara H, Abe H. Corneal endothelial damage after trabeculectomy with mitomycin C in two patients with glaucoma and cornea guttata. *Cornea*. 2002;21(3):300-4.
19. Liu CJ, Tsei CC, Chon JC, Liu JH. Combined trabeculectomy and extracapsular cataract extraction with mitomycin C. *Zhonghua YiXue Za Zhi (Taipei)*. 1997;60(4):205-12.
20. Derick RJ, Pasquale L, Quigley HA, Jampel H. Potential toxicity of mitomycin C. *Arch Ophthalmol*. 1991;109(12):1635.
21. Cheeks L, Harris C, Grenn K. Corneal endothelial toxicity of mitomycin C. *J Toxicol Cutaneous Ocul Toxicol*. 1993;12(1):59-66.
22. Hernandez-Galilea E, Sanchez F, Guzman K, Moro MJ, Vazquez R, Barahona JM. [Efecto de la mitomicina C sobre el endotelio corneal. Estudio in Vitro]. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2000;75(8):515-21. Spanish.
23. McDermott ML, Wang J, Shin DH. Mitomycin and human corneal endothelium. *Arch Ophthalmol*. 1994;112(4):533-7.
24. Wang J, McDermott ML, Cowden JW, Shin DH. Mitomycin C and the human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34:1195.
25. Anglade E, Dreyer E. The effect of mitomycin C and 5-fluorouracil on corneal endothelium in trabeculectomy surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34:730.
26. Pastor SA, Williams R, Hetherington J, Dunbar Hoskins H, Goodman D. Corneal endothelial cell loss following trabeculectomy with mitomycin C. *J Glaucoma*. 1993;2(2):112-3.
27. Dreyer EB, Chaturvedi N, Zurakowski D. Effect of mitomycin C and fluorouracil supplemented trabeculectomies on the anterior segment. *Arch Ophthalmol*. 1995;113(5):578-80.
28. Nuyts RM, Holley GP, Edelhauser HF. Effects of mitomycin C on the corneal endothelium. *J Toxicol Cutaneous Ocul Toxicol*. 1995;14(4):251-64.
29. Mishima S. Clinical investigations on the corneal endothelium. XXXVIII Eduardo Jackson Memorial lecture. *Am J Ophthalmol*. 1982;93(1):1-29.
30. Smith DL, Skuta GL, Lindenmuth KA, Mush DC, Bergstrom TJ. The effect of glaucoma filtering surgery on corneal endothelial cell density. *Ophthalmic Surg*. 1991;22(5):251-5.