

# Efeito do TGF- $\beta$ 2 e do TNF- $\alpha$ na cicatrização do epitélio pigmentado da retina humana: estudo “in vitro”

*TGF- $\beta$ 2 and TNF- $\alpha$  effects on human RPE wound healing*

Antonio Marcelo B. Casella<sup>(1, 2, 3)</sup>  
Michel Eid Farah<sup>(3)</sup>  
Pedro Paulo O. Bonomo<sup>(3)</sup>  
Stephen J. Ryan<sup>(1)</sup>

## RESUMO

**Proposição:** Determinar o efeito do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e do fator de transformação do crescimento beta 2 (TGF- $\beta$ 2) na migração e proliferação do epitélio pigmentado da retina (EPR) em um sistema simplificado de cicatrização *in vitro*.

**Métodos:** Culturas confluentes e subconfluentes de células do EPR humano foram desnudadas centralmente em 2 mm de largura com uma lâmina cortante. As culturas foram observadas na presença de TGF- $\beta$ 2 (10 ng/ml), TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) ou meio de cultura para células (DMEM), após 24, 48, 72, e 96 horas. A migração foi acessada por contagem do número de células na região desnuda. A proliferação foi acessada pela contagem da porcentagem de células positivas por imunohistoquímica para o antígeno Ki-67 (relacionado à proliferação celular) na região desnuda e na margem da lesão.

**Resultados:** As culturas controles apresentaram cicatrização após 72 horas em culturas confluentes e após 96 horas em culturas subconfluentes. O fechamento ocorreu principalmente por migração embora a proliferação estivesse aumentada após 24 horas nas células migrantes e na margem da lesão. O TNF- $\alpha$  estimulou a cicatrização da ferida primariamente pelo aumento da migração após 24 e 48 horas. O TGF- $\beta$ 2 inibiu a cicatrização por meio da inibição da migração e proliferação. O efeito do TNF- $\alpha$  foi mais intenso em culturas subconfluentes, e o efeito do TGF- $\beta$ 2 em culturas confluentes.

**Conclusão:** A cicatrização da ferida ocorreu principalmente pela migração do EPR, embora a proliferação estivesse envolvida. A cicatrização da ferida foi estimulada pelo TNF- $\alpha$  e inibida pelo TGF- $\beta$ 2.

**Palavras-chave:** Epitélio pigmentado da retina; Cultura de tecido; Cicatrização

Este trabalho foi realizado no “Doheny Vision Research Center, University of Southern California, Los Angeles”, Califórnia, Estados Unidos da América, em conjunto com o Departamento de Oftalmologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Escola Paulista de Medicina (EPM), São Paulo, Brasil.

<sup>(1)</sup> The Doheny Eye Institute and Department of Ophthalmology - University of Southern California School of Medicine, Los Angeles, CA.

<sup>(2)</sup> Departamento de Cirurgia, Universidade Estadual de Londrina - Londrina - PR - Brasil.

<sup>(3)</sup> Departamento de Oftalmologia, Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

**Endereço para correspondência:** Antonio Marcelo Barbante Casella - Avenida Bandeirantes, 500, sala 109 - CEP 86010-010 - Londrina - PR - Brasil  
- Fax: (043) 321 1758  
E-mail: mcasella@sercomtel.com.br

## INTRODUÇÃO

A integridade do epitélio pigmentado da retina (EPR) é crítica para a função da retina externa. A lesão da retina externa pelo trauma ocular<sup>5</sup> ocasiona falhas na monocamada do EPR, podendo deslocar células para o espaço subretiniano ou vítreo. A resposta cicatricial à injúria traumática inclui a tentativa de reparar a monocamada, mas também estimula o crescimento de células

para o vítreo resultando em doenças proliferativas como a proliferação vitreoretiniana (PVR)<sup>5</sup>. O EPR produz e responde a uma variedade de citocinas<sup>1, 4, 8, 9</sup> que podem estar envolvidas na resposta cicatricial retiniana.

Dois agentes que podem ser críticos na resposta cicatricial retiniana, particularmente em PVR, são o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>8</sup> e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ )<sup>4</sup>.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflama-

tória usualmente liberada por leucócitos ativados no local da resposta inflamatória<sup>1</sup>, podendo estimular a proliferação do EPR e regular certas moléculas de adesão como o ICAM-1<sup>1</sup>. O TNF- $\alpha$  foi encontrado no vítreo de pacientes com descolamento de retina e membranas vítreas<sup>8</sup>, sugerindo seu envolvimento na cicatrização do EPR. O TGF- $\beta$  compreende uma família de citocinas multifuncionais<sup>4</sup> sendo o TGF- $\beta$ 2 o mais predominante encontrado em tecido retiniano e vítreo<sup>9</sup>. O TGF- $\beta$  afeta diretamente a proliferação através de efeitos inibitórios no ciclo celular<sup>9</sup>, regula a produção e a remodelagem de componentes da matrix extracelular incluindo alguns colágenos<sup>9</sup> e é o regulador da diferenciação e migração de certos tipos celulares<sup>4</sup>. Em pacientes com PVR, o nível de TGF- $\beta$  se correlaciona com fibrose<sup>4</sup>, desempenhando um papel nas fases tardias da PVR.

Modelos *in vitro* e *in vivo* foram descritos para avaliar a cicatrização retiniana<sup>2,10</sup>. Neste estudo, determinamos os efeitos do TNF- $\alpha$  e do TGF- $\beta$ 2 na cicatrização do EPR em um novo sistema de cicatrização *in vitro*, no qual proliferação e migração podem ser estudados *in situ*.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Células do EPR obtidas a partir de olhos fetais humanos foram cultivadas por três dias em pratos com seis círculos de 50 mm de diâmetro (Falcon, Becton Dickinson, EUA), em uma densidade de cem mil células por círculo para o estudo em confluência e 50 mil células, por círculo, para o estudo em subconfluência. Uma lâmina especial para esses procedimentos (Ted Pela, USA) foi usada para desnudar uma área de 2 mm de largura por aproximadamente 2 cm de comprimento em cada círculo de células. A ferida foi realizada sob um microscópio de dissecação (Zeiss, Alemanha), utilizando-se longitudinalmente uma fita adesiva gráfica (3M, USA), como guia, fixa na parte posterior dos

pratos de cultura e, centralmente, em cada círculo antes de cultivar as células. Feridas mais largas ou mais estreitas do que 5% de 2 mm não eram utilizadas. Logo após a realização da ferida, as células eram lavadas três vezes em solução balanceada de Hank (HBSS; Bio Whittaker, EUA) para remoção das células flutuantes. As feridas eram examinadas após 24, 48, 72 e 96 horas da sua realização. Após a terceira lavagem, o meio de cultura era trocado por outro novo sem citocina, que passou a ser a cultura controle do estudo em questão, ou por um meio contendo TGF- $\beta$ 2 na concentração de 10 ng/ml (Genzyme, EUA) ou TNF- $\alpha$  na concentração de 10 ng/ml (Boeringer Mannheim, Alemanha).

Todos os experimentos foram realizados oito vezes, com soro bovino fetal (SBF) a 10%. Para avaliar o efeito da concentração deste soro, realizou-se o mesmo experimento com a concentração igual a 1% nos períodos de 24 e 48 horas para células em subconfluência e 24, 48 e 72 horas para células em confluência.

#### Avaliação da migração e proliferação das células

As culturas foram fixadas com paraformaldeído a 1% por 15 minutos e lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Foi usado o método de imunoperoxidase Avidin-Biotin, (ABC Elite, Vector, EUA), utilizando-se o anticorpo monoclonal Ki-67, (Dako, USA), que identifica um antígeno nuclear em todas as células proliferantes, durante as fases G1, tardia, S, M e G2 do ciclo celular e está consistentemente ausente na fase G0<sup>7</sup>. A porcentagem de núcleos positivos, identificados pelo cromógeno vermelho amino *ethylcarbazole*, dá uma estimativa da fração de crescimento observada na população celular. As culturas foram contrastadas com hematoxilina para identificar núcleos negativos para Ki-67. Todas as culturas foram escolhidas aleatoriamente e analisadas, sem se saber a que

período pertenciam ou que droga foi usada. Uma grade de 1 cm foi adaptada à ocular (10X) e usada para medir a largura da ferida e contar o número de células que migraram. Foram analisadas três áreas contínuas de 1 mm, no centro da ferida, junto à margem externa da lesão. Estas regiões foram fotografadas e as células contadas. Todas as células da área central desnuda representavam as células que migraram. A fração de crescimento foi expressa pelo número de células positivas para Ki-67, divididas pelo número total de células na grade.

#### Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) foi usada para determinar a significância geral de cada área em relação ao tempo, adotando-se o nível de significância  $\alpha = 0,05$ . Quando a ANOVA apresentou um resultado estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) aplicou-se o teste t pareado, considerando o nível de significância ajustado ao número de comparações pareadas.

#### RESULTADOS

##### Culturas controle: tempo de fechamento da ferida

As feridas apresentaram margens laterais bem definidas, e um padrão homogêneo de fechamento (figura 1; tabelas 1 e 2). As células proliferantes apresentaram-se com o núcleo avermelhado (figura 2). Em 24 horas as células do EPR começaram a migrar da margem da ferida, tornando-se mais alongadas. Neste período, as células migrantes demonstraram a maior fração de crescimento, sendo 4,32% nas culturas confluentes com SBF a 10% e 3,13% nas culturas subconfluentes com SBF a 10%. Na margem da ferida a fração de crescimento também aumentou sendo 1% das células em confluência e 2% nas em subconfluência com SBF a 10%. Após 48 horas, o número de células migrantes aumentou, e a fração de crescimento diminuiu na margem da fe-

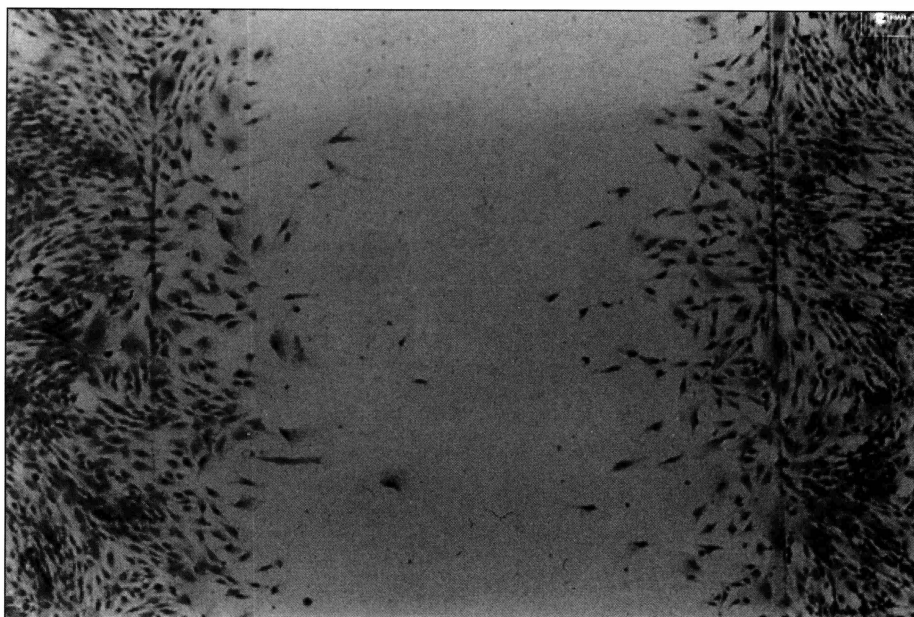


Fig.1 - Fotomicrografia demonstrando um padrão migratório similar nos dois lados da ferida. Culturas confluentes controle, com SBF a 10% (50X).

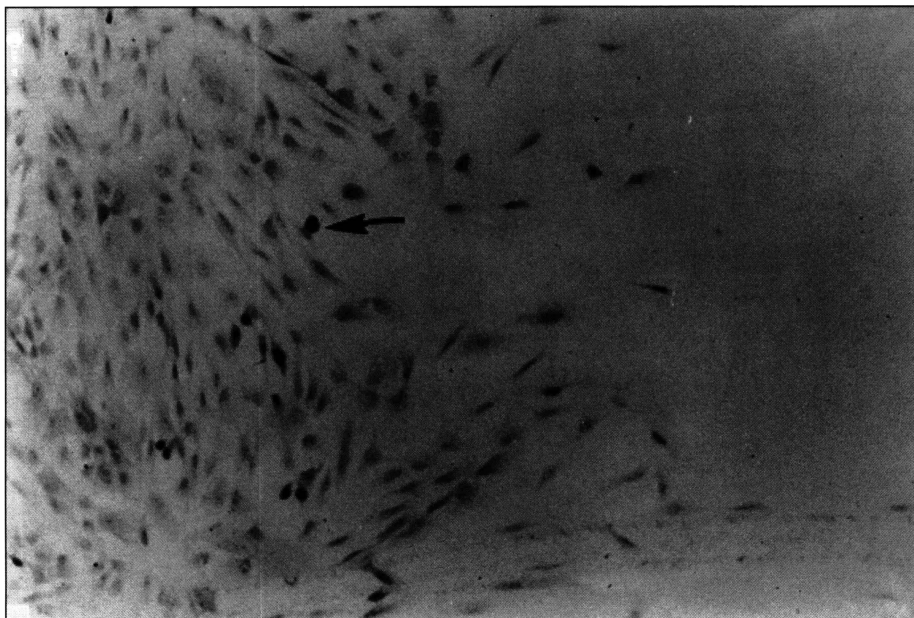


Fig.2 - Fotomicrografia demonstrando células positivas para o antígeno Ki-67 (seta) que se apresenta com o núcleo vermelho; células não positivas para o antígeno apresentaram-se com o núcleo em tonalidade azulada (100X).

rida. Observou-se uma fração de crescimento de 1,5% e 1,91% nas células em confluência e subconfluência, nas culturas com SBF a 10%. As culturas confluentes se fecharam após 72 horas

e as subconfluentes após 96 horas (tabelas 1 e 2). A fração de crescimento para culturas com SBF a 1% foi 2,5% e 4% para culturas confluentes e subconfluentes, respectivamente.

#### **Culturas estimuladas com citocina: migração na ferida**

O TNF- $\alpha$  nas culturas com SBF a 10% resultou em um aumento significativo na migração na ferida em culturas confluentes e subconfluentes (tabelas 1 e 2). Um efeito similar foi observado nas culturas com SBF a 1%. Após 72 horas o TNF- $\alpha$  não aumentou a migração e a ferida se fechou no mesmo tempo que as feridas controles. Em contraste o TGF- $\beta$ 2 diminuiu, significativamente a migração na ferida em culturas confluentes e subconfluentes (tabelas 1 e 2) com SBF a 10%. As feridas com TGF- $\beta$ 2 mostraram uma inibição marcante da cicatrização, fazendo com que a maior parte das feridas não estivessem totalmente cicatrizadas, em condições de confluência e subconfluência, após 96 horas.

#### **Culturas estimuladas com citocinas: proliferação na ferida.**

Quando estudada na presença de SBF a 10% a fração de crescimento na ferida em culturas estimuladas com TNF- $\alpha$  não aumentou significativamente, porém quando todos os períodos foram analisados em conjunto observou-se um significativo aumento na fração de crescimento nas culturas subconfluentes comparadas com as controles. Um efeito similar foi observado com SBF a 1%, contudo o aumento da fração de crescimento atingiu significância individual após 48 horas. Nas culturas confluentes com SBF a 10%, a fração de crescimento não aumentou, observando-se porém uma inibição altamente significativa após 96 horas.

#### **Culturas estimuladas com citocinas: proliferação na margem da ferida.**

A fração de crescimento esteve aumentada após 24 horas em todas as culturas com SBF a 10% ( $p < 0,001$ ). Nas culturas confluentes com TGF- $\beta$ 2 e SBF 10% observou-se um decréscimo significativo na fração de crescimento da margem da ferida após 72 e 96 horas ( $p < 0,005$ ). Este efeito inibitório também foi observado nas culturas subconfluentes com

Efeito do TGF- $\beta$ 2 e do TNF- $\alpha$  na cicatrização do epitélio pigmentado da retina humana: estudo "in vitro"

TABELA 1

Média (X), Desvio Padrão (DP) e número de experimentos analisados ( $\eta$ ) para migração em culturas confluentes com FBS a 10%: comparação do TGF- $\beta$ 2 e do TNF- $\alpha$  com as culturas controles.

Migração Confluente	Controle		TGF- $\beta$ 2			TNF- $\alpha$		
	Média $\pm$ DP	( $\eta$ )	Média $\pm$ DP	( $\eta$ )	p	Média $\pm$ DP	( $\eta$ )	p
24 Horas	58,75 $\pm$ 12,89	(4)	51,25 $\pm$ 18,57	(4)	(NS)	90,75 $\pm$ 12,28	(4)	0,3
48 Horas	151,00 $\pm$ 29,743	(4)	92,5 $\pm$ 20,207	(4)	0,02	225,25 $\pm$ 27,439	(4)	0,006
72 Horas	435,25 $\pm$ 121,07	(4)	175,33 $\pm$ 26,159	(3)	0,02	530,75 $\pm$ 125,86	(4)	NS
96 Horas	1035,00 $\pm$ 18,672	(4)	267,333 $\pm$ 34,58	(3)	<0,001	1040,00 $\pm$ 55,677	(4)	NS
Total	420,00 $\pm$ 409,54	(16)	153,92 $\pm$ 87,13	(14)	<0,001	433,08 $\pm$ 362,64	(16)	NS

\*Valor de p ajustado para o número de comparações dos grupos de TGF- $\beta$ 2 e TNF- $\alpha$  e com o controle (teste t)

TABELA 2

Média (X), Desvio Padrão (DP) e número de experimentos analisados ( $\eta$ ) para fração de crescimento na ferida em culturas confluentes com FBS a 10%: comparação do TGF- $\beta$ 2 e do TNF- $\alpha$  com as culturas controles.

Proliferação Confluente	Controle		TGF- $\beta$ 2			TNF- $\alpha$		
	Média $\pm$ DP	( $\eta$ )	Média $\pm$ DP	( $\eta$ )	p	Média $\pm$ DP	( $\eta$ )	p
24 Horas	0,0432 $\pm$ 0,0163	(8)	0,0397 $\pm$ 0,0175	(8)	NS	0,0579 $\pm$ 0,0233	(8)	NS
48 Horas	0,0150 $\pm$ 0,00372	(8)	0,015531 $\pm$ 0,00508	(8)	NS	0,0144 $\pm$ 0,000046	(8)	NS
72 Horas	0,008515 $\pm$ 0,002735	(8)	0,002932 $\pm$ 0,001129	(6)	0,003	0,008806 $\pm$ 0,00654	(8)	NS
96 Horas	0,00571 $\pm$ 0,002202	(8)	0,000624 $\pm$ 0,000865	(8)	<0,001	0,001421 $\pm$ 0,000886	(6)	<0,001
Total	0,0181 $\pm$ 0,0171	(32)	0,0155 $\pm$ 0,0183	(30)	NS	0,0219 $\pm$ 0,0254	(30)	NS

\*Valor de p ajustado para o número de comparações dos grupos de TGF- $\beta$ 2 e TNF- $\alpha$  e com o controle (teste t)

TGF- $\beta$ 2 e SBF a 10% após 96 horas ( $p < 0,001$ ). Nas culturas com TNF- $\alpha$  e SBF a 10% não se observou aumento na proliferação na margem da ferida, mas após 96 horas a fração de crescimento foi significativamente inibida ( $p < 0,005$ ) nas culturas confluentes. Em baixa concentrações de soro, a fração de crescimento se manteve muito baixa. Após 48 horas o TNF- $\alpha$  estimulou a proliferação ( $p < 0,005$ ) e o TGF- $\beta$ 2 inibiu ( $p < 0,005$ ), contudo o efeito foi menos dramático que na presença de SBF a 10%.

## DISCUSSÃO

Migração e proliferação de células do EPR desempenham um papel importante na resposta cicatricial da ferida por traumas<sup>5</sup> como: crioterapia, fotocoagulação a laser, diatermia, neovascularização sub-retiniana (NVSR), trauma perfurante e PVR.

O TNF- $\alpha$  e o TGF- $\beta$ 2 têm sido implicados na resposta ao trauma e o melhor entendimento destes fatores pode per-

mitir modular reações biomoleculares<sup>1, 4, 8, 9</sup>. A análise *in situ*, da migração e proliferação do EPR tem sido realizada em uma variedade de modelos *in vivo* e *in vitro*.

CAMPOCHIARO *et al.*<sup>2</sup> estudaram os efeitos do soro usando uma câmara de Boyden modificada para verificar a migração e a proliferação separadamente, concluindo que o soro contém quimioatrativos para células do EPR. VERS-TRAETEN *et al.*<sup>10</sup> observaram a inibição farmacológica da migração do EPR, *in vitro*, na cicatrização da ferida e analisaram a proliferação após tripsinização das células, concluíram que o sistema de cicatrização *in vitro* é um ótimo meio para avaliação da dinâmica das células do EPR.

Estudos em cultura de órgãos no homem são limitados pela disponibilidade de tecido, mesmo em centros avançados<sup>3</sup>. O estudo do efeito de Citocinas sobre o EPR em modelos, *in vivo*, pode levar a problemas tais como manter estes mediadores limitados ao espaço sub-retiniano, e por ser difícil

injetá-los sem lesar a membrana de Bruch. CAMPOCHIARO *et al.*<sup>2</sup> relataram que as culturas de EPR simulam em muitos aspectos a cicatrização do EPR, *in situ*. Células do EPR em culturas são capazes de estimular o crescimento de vários tipos celulares, indicando que culturas podem secretar uma ou mais citocinas no meio de cultura<sup>2</sup>.

O presente modelo, com margens bem definidas, permitiu uma avaliação precisa da migração e análise da proliferação *in situ*. Analisou-se como as células reagem ao estímulo da lesão, nas margens e dentro da ferida. O estudo das células subconfluentes permitiu a melhor reprodução das células na cavidade vítrea, onde se apresentam temporariamente esparsas, como na PVR; por outro lado, as confluentes permitiram analisar como o EPR reagiria ao trauma em uma monocamada, como na degeneração macular senil e no buraco macular. A migração mostrou-se mais importante do que a proliferação.

A expressão gênica e a secreção de TNF- $\alpha$ , demonstradas inicialmente em células hematopoiéticas, como macrófagos e células T, podem ocorrer em células do EPR estimuladas e em membranas pré-retinianas do homem<sup>8</sup>. Em seu estudo, BURKE<sup>1</sup> demonstrou que o TNF- $\alpha$  é a citocina de maior efeito mitogênico em cultura de células do EPR de baixa densidade.

O TNF- $\alpha$  estimulou a proliferação e migração do EPR no modelo de cicatrização. A proliferação foi mais pronunciada em culturas subconfluentes, como previamente demonstrado<sup>1</sup>, sendo possível que os receptores para TNF- $\alpha$  sejam mais numerosos em células do EPR, em subconfluência. Nas células confluentes, após 96 horas, observou-se inibição tardia da proliferação sendo o efeito migratório do TNF- $\alpha$  registrado após 24 e 48 horas. Este efeito estimulatório na migração e proliferação celulares sugere que o TNF- $\alpha$  desempenha um papel importante na fase inicial da cicatrização.

A maioria das células tem demons-

trado sintetizar e expressar receptores para o TGF- $\beta$ .

O TGF- $\beta$ 2 induziu uma forte inibição da proliferação e migração de células do EPR no sistema de cicatrização da ferida. A inibição da proliferação foi observada em culturas com SBF a 10%, que deve ser relacionada a fatores sinérgicos, presentes no soro, conforme descreveram CAMPOCHIARO *et al.*<sup>2</sup>. A inibição da migração celular ainda foi observada no grupo com SBF a 1%, reforçando a idéia de migração e proliferação serem efeitos não correlacionados<sup>2</sup>.

Publicações prévias do TGF- $\beta$ 2, promovendo fibrose<sup>4,9</sup> associada a esta pesquisa, levam a acreditar que o TGF- $\beta$ 2 tem o seu papel nas fases tardias da PVR, quando a fibrose prevalece e não existem migração e proliferação suficientes.

A despeito de o TGF- $\beta$ 2 promover proliferação glial, e ter sido usado como fator coadjuvante em cirurgias do buraco macular, o forte efeito inibitório na cicatrização do EPR pode ser considerado um dos fatores responsáveis por controvérsias existentes quanto às necessidades e ou eficácia do TGF- $\beta$ 2<sup>6</sup>.

Este modelo de cicatrização do EPR provou ser efetivo para detectar os efeitos das citocinas. O TNF- $\alpha$  demonstrou promover migração e proliferação e o TGF- $\beta$ 2 revelou inibir a proliferação e migração de células do EPR, sendo que estes efeitos são dependentes da densidade de cultura.

O perfeito entendimento do papel desempenhado no processo de reparação tecidual das citocinas, poderá permitir o melhor entendimento dos estímulos presentes neste processo. O uso de bloqueadores e ou antagonistas específicos poderá modular processos exagerados de cicatrização tecidual.

#### SUMMARY

Purpose: To determine the effects of tumor necrosis factor

*alpha (TNF- $\alpha$ ) and transforming growth factor beta2 (TGF- $\beta$ 2) on retinal pigment epithelium (RPE) migration and proliferation in a simplified wound healing system in vitro.*

*Methods: Confluent and subconfluent human RPE cultures were centrally denuded and, the cultures were observed in the presence of TGF- $\beta$ 2 (10 ng/ml), TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) or media alone (DMEM), after 24, 48, 72 and 96 hours. The migration was evaluated by counting the number of cells in the denuded area. The proliferation was assessed in situ by counting the percentage of positive cells by immunohistochemistry for the proliferation-related antigen Ki-67 in the denuded region and at the edge of the wound.*

*Results: The control confluent cultures closed in approximately 72 hours, while the subconfluent cultures closed in approximately 96 hours. The closure occurred predominantly by migration although proliferation was increased at 24 hours both in the migrating cells and at the wound edge. TNF- $\alpha$  stimulated wound closure primarily by increasing migration in 24 and 48 hours. TGF- $\beta$ 2 decreased wound closure by inhibiting proliferation in 72 and 96 hours and migration in 48, 72 and 96 hours. The TNF- $\alpha$  effect was more intense in presence of subconfluent cultures, and the TGF- $\beta$ 2 effect was more intense in confluent cultures.*

*Conclusion: Healing of a denuded zone in RPE cultures was related predominantly to*

*cellular by RPE migration although proliferation was also involved. RPE wound closure was stimulated by TNF- $\alpha$  and inhibited by TGF- $\beta$ 2.*

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BURKE, J. M. - Stimulation of DNA synthesis in human and bovine RPE by peptide growth factors: the response to TNF- $\alpha$  and EGF is dependent upon culture density. *Curr. Eye Res.*, **8**: 1279-1284, 1989.
2. CAMPOCHIARO, P. A.; JERDAN, J. A.; GLASER, B. M. - Serum contains chemoattractants for human retinal pigment epithelial cells. *Arch. Ophthalmol.*, **102**: 1830, 1984.
3. CASELLA, A. M. B.; SPEE, C.; KIMURA, H.; CARDILLO, J. A.; HINTON, D. R.; RYAN, S. J. Cytokine Modulation of MHC-CLASS II Expression in organ culture model in human eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **37**: S544, 1996.
4. CONOR Jr., T. B. J.; ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B.; DANIELPOUR, D.; DART, L. L.; MICHELS, R. G.; BUSTROS, S.; ENGER, C.; KATO, H.; LANSING, M.; HAYASHI, H.; GLASER, B. M. Correlation of fibrosis and transforming growth Factor- $\beta$  type 2 levels in the eye. *J. Clin. Invest.*, **83**: 1661-1666, 1989.
5. FARAH, M. E.; BLUMENKRANZ, M.; PAREL, J.-M.; BONOMO, P. P.; BELFORT, R. Jr.; DE LIMA, A., L., H. - Estudo experimental comparativo da crioterapia, diatermia, e laserterapia via "pars plana". *Rev. Brasil. Oftalmologia*, **50**: 15-27, 1991.
6. FREEMAN, W.R. - Vitrectomy surgery for full-thickness macular holes (Editorial). *Am. J. Ophthalmol.*, **116**: 233-235, 1993.
7. GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H. - Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer*, **31**: 13-20, 1983.
8. LITTLE, B. C.; LIMB, G. A.; MEAGER, A.; OGILVIE, J. A. E.; WOLTENSCROFT, R. A.; FRANKS, W. A.; CHIGNELL, A. H.; DUMOND, D. C. - Cytokines in proliferative vitreoretinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **32**: 768, 1991.
9. PFEFFER, B. A.; FLANDERS, K.C.; GUÉRIN, C. J.; DANIELPOUR, D.; ANDERSON, D. H. - Transforming growth factor beta 2 is the predominant isoform in the neural retina, retinal pigment epithelium-choroid and vitreous of the monkey eye. *Exp. Eye Res.*, **59**: 323-333, 1994.
10. VERSTRAETEM, T. C.; BUZNEY, S.M.; MacDONALD, S. G.; NEUFELD, A.H. - Retinal pigment epithelium wound closure in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **31**: 481-488, 1990.