

Efeito do colírio de 5-fluorouracil sobre o epitélio corneano íntegro de coelhos

Effects of 5-fluorouracil eye drops on intact rabbit corneal epithelium

Lucieni Cristina Barbarini Ferraz¹
Silvana Artiofi Schellini²
Elisa Aparecida Gregório³

RESUMO

Objetivo: Observar os efeitos da aplicação tópica de 5-fluorouracil (5-FU) sobre o epitélio corneano íntegro. **Métodos:** Foram utilizados 10 coelhos albinos (14 olhos), divididos em: grupo controle (GC), 4 olhos nos quais não se administraram drogas, grupo 1 (G1), 5 olhos que receberam 5-fluorouracil na concentração 1,25% e grupo 2 (G2), 5 olhos que receberam 5-fluorouracil na concentração de 2,5%. A droga foi instilada 4 vezes por dia, durante 7 dias, quando os animais foram sacrificados, os olhos removidos, separando-se a córnea que foi preparada de modo convencional para estudo em microscópio eletrônico de varredura. **Resultados:** GC: observaram-se células de formato hexagonal, claras, escuras e intermediárias, compondo o epitélio corneano de coelhos. Presença de numerosas microplacas, principalmente nas células claras. Cada célula possui cerca de 1 a 3 criptas. Nos animais do G1, observou-se maior número de células escuras, regiões com diminuição no número de criptas; alterações da superfície celular, protusão na região do núcleo e descamação de células epiteliais. Os do G2 tiveram aumento de microprojeções na superfície celular, modificações nas junções intercelulares até separação de células adjacentes; diminuição do número e variabilidade no tamanho das criptas. As alterações mais frequentes ocorreram nas células da periferia da córnea. **Conclusão:** O 5-fluorouracil teve efeitos deletérios no epitélio íntegro corneano de coelhos. As alterações observadas foram mais importantes nos animais que receberam a droga mais concentrada (G2) e mais frequentes na periferia da córnea.

Descritores: Fluorouracil/administração & dosagem; Córnea/ultraestrutura; Epitélio da córnea/ultraestrutura; Microscopia eletrônica de varredura; Coelhos; Soluções oftálmicas

INTRODUÇÃO

O 5-fluorouracil (5-FU) tópico na concentração de 1% tem sido usado com sucesso no tratamento de lesões pré-malignas da pele e membranas mucosas⁽¹⁾ e na concentração de 2,5%, como tratamento coadjuvante para prevenir a recidiva do pterígio⁽²⁾.

Droga citostática e de ação antimetabólica, o 5-FU inibe a formação do DNA com potencial de toxicidade seletiva para o epitélio displásico, sendo promissor como tratamento coadjuvante em neoplasia epitelial da conjuntiva e da córnea⁽¹⁾.

Estudo sobre aplicação tópica de 5-FU 2,5%, na região do limbo corneoescleral de coelhos, mostrou que este não possui efeitos deletérios para os tecidos oculares adjacentes perceptíveis à microscopia óptica⁽³⁾.

O presente trabalho teve por objetivo conhecer os efeitos da aplicação tópica do colírio de 5-FU sobre o epitélio corneano de coelhos, observados à microscopia eletrônica de varredura.

¹ Pós-graduanda do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista - UNESP.

² Professora Livre-Docente do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista - UNESP.

³ Professora Titular do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP.

Endereço para correspondência: Depto. OFT/ORL/CCP Faculdade de Medicina de Botucatu - Botucatu (SP) CEP 18618-970 - E-mail: sartioli@fmb.unesp.br

Recebido para publicação em 29.01.2002

Aceito para publicação em 06.03.2003

Nota Editorial: Pela análise deste trabalho e por sua anuência na divulgação desta nota, agradecemos ao Dr. Eduardo Menali Rocha.

MÉTODOS

O estudo foi realizado usando coelhos albinos, pesando entre 2050g a 2490g, fornecidos pelo Biotério Central - Campus de Botucatu - UNESP.

Foram utilizados 10 coelhos que receberam 5-FU em um dos olhos, divididos nos seguintes grupos experimentais:

Grupo 1 (G1): 5 olhos que receberam 5-FU na concentração de 1,25% no olho direito.

Grupo 2 (G2): 5 olhos receberam 5-FU na concentração de 2,5% no olho direito.

Grupo controle (GC): 4 olhos esquerdos, olhos contralaterais de animais do G1 e que não receberam instilação de substâncias.

A frequência de instilação da droga em G1 e G2 foi de 4 vezes por dia, durante 7 dias⁽¹⁾, tendo sido os animais neste período avaliados clinicamente por meio de exame externo e usando-se colírio de fluoresceína 2%.

Após 1 semana, os animais foram sacrificados por injeção rápida de sobredose de pentobarbital sódico, usando-se a

veia marginal da orelha. Em seguida, realizou-se a retirada da córnea dos animais por peritomia límbica em 360 graus e delaminação da esclera com bisturi lâmina 15. As córneas foram cuidadosamente colocadas em solução de glutaraldeído 2% para fixação, pós-fixadas em ácido ósmico 0,5%, desidratadas em série crescente de álcoois, ponto crítico com CO₂ e metalizadas com 15 nm de ouro, conforme rotina de preparação de materiais para microscopia de varredura, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências - Unesp⁽⁴⁾.

O exame foi realizado sem o conhecimento prévio de qual grupo pertenciam os animais, analisando-se o aspecto da superfície corneana na periferia e no centro da córnea de todos os animais. Os animais foram sacrificados pela mesma pessoa que examinou o material da microscopia eletrônica, tendo sido o material processado pela equipe do laboratório.

As alterações observadas seguiram critério de avaliação subjetivo, semiquantificadas em cruzes, sendo o mais leve considerado +, até o mais grave ++++.

RESULTADOS

Clinicamente nenhum animal apresentou fotofobia, lacrimajamento ou lesões coráveis por fluoresceína, durante todo o período experimental.

Avaliação ultraestrutural

GC: o epitélio corneano de coelhos é constituído por células hexagonais, claras, escuras e intermediárias. Principalmente sobre as células claras, observou-se escassas microplicas; presença de criptas, em número de 1 a 3 em cada célula, principalmente nas células observadas na periferia da córnea; na área central, o número de criptas foi menor (Figura 1).

G1: em relação ao GC, o G1 apresentou aumento do número de criptas. Observou-se descamação focal de células epiteliais, na periferia e no centro, aumento dos microvilos; algu-

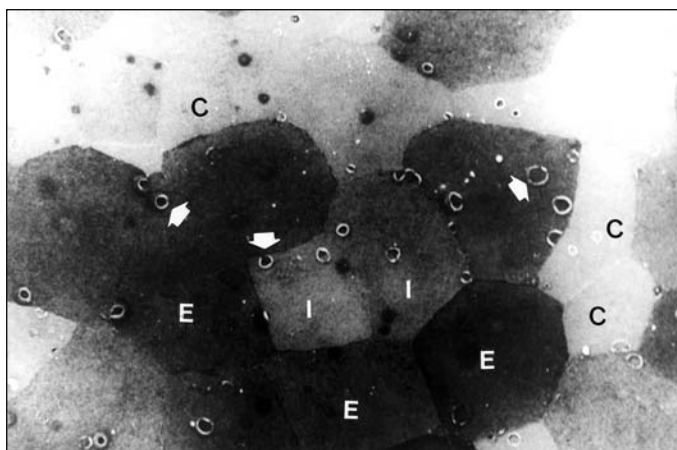


Figura 1 - Epitélio corneano de coelho do grupo controle (GC) com células hexagonais, claras (C), escuras (E) e intermediárias (I). Presença de criptas (seta) (1110x)

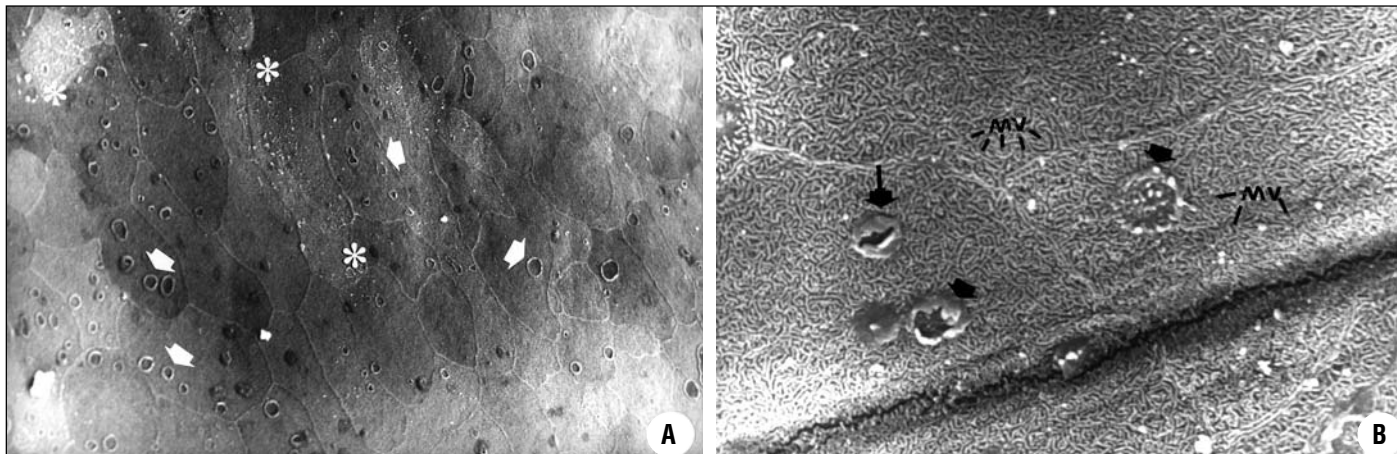


Figura 2 - Epitélio corneano de coelho do G1. A: Descamação focal de células epiteliais(+) e aumento do número de criptas (seta) (1110x); B: Microvilos (-MV-) e criptas (seta) (5280x)

mas células com protusão na região do núcleo (Figura 2 a, b).

G2: comparativamente ao G1, observou-se no G2 maior intensidade de alterações. Aumento de microprojeções na superfície celular, assim como presença de grandes dobras; modificações nas junções intercelulares, com aumento do espaço entre células adjacentes. A descamação de células epiteliais foi evidente, iniciando-se na área de união entre células e progredindo em direção ao centro. As alterações foram mais acentuadas na periferia da córnea, observando-se nesta região maior número de criptas e maior intensidade de descamação. A descamação ocorreu principalmente nas células escuras (Figura 3 a, b, c, d).

No quadro 1 estão apresentadas, de maneira semiquantitativa, as observações do exame ultraestrutural.

DISCUSSÃO

O 5-FU é tido como droga citostática de ação seletiva sobre o epitélio displásico⁽¹⁾. O seu uso em Oftalmologia tem se ampliado e os efeitos reais desta droga sobre o epitélio corneano são ainda pouco conhecidos, o que motivou a realização do presente estudo.

Para avaliação dos efeitos de drogas sobre os tecidos, vários são os tipos de estudos que podem ser realizados. Optou-se pela avaliação à microscopia eletrônica de varredura, método que recentemente vem sendo bastante utilizado para investigação da tolerância a preparações (soluções, drogas) oftalmológicas⁽⁵⁻⁶⁾.

Pesquisas sobre os efeitos do 5-FU sobre a córnea mostram que só existe alteração quando a aplicação é feita após desepitelização prévia da superfície corneana⁽⁷⁻⁸⁾.

Porém, o que foi constatado no presente estudo foi que o epitélio corneano intacto também sofre a ação do 5-FU.

As texturas diferentes, observadas em células epiteliais da córnea mesmo em coelhos do grupo controle, já haviam sido relatadas e parecem estar relacionadas ao fenômeno de renovação epitelial⁽⁹⁾. As células claras apresentavam numerosas projeções e as escuras não. As células mais velhas descamam e perdem a habilidade de prender o filme lacrimal, o que contribui para que se observem células de diferentes características.

O fenômeno da descamação das células se acentuou sob o efeito do 5-FU, principalmente em animais que receberam a droga mais concentrada (G2), podendo ser traduzido também pelo maior encontro das células escuras neste grupo. Por outro lado, o fato dos olhos controles não terem recebido nenhum colírio, pode ter acentuado as diferenças observadas, pois é conhecido o efeito de conservantes, soluções alcalinas e outras substâncias sobre o epitélio da córnea⁽⁸⁾. Avaliações usando microscopia eletrônica de varredura mostraram que a córnea é extremamente sensível às influências mecânicas, farmacológicas, metabólicas; assim, radiação ultravioleta ou tetracaina tópica 0,5% pode causar perda de microprojeções,

enquanto cocaína tópica a 4% e cloreto de benzalcônio 0,01% resultam em ruptura plasmática e descamação das células superficiais⁽⁸⁾.

Sabe-se que o epitélio corneano tem importante função de barreira, impedindo a passagem de substâncias do meio externo para o estroma, devido à presença de junções aderentes entre células epiteliais. Com a descamação celular exagerada, este mecanismo pode estar comprometido, resultando em alterações estromais.

A intensidade da agressão foi diferente no centro e na periferia corneana, confirmada pela maior intensidade de descamação e também por aumento no número de criptas na periferia da córnea. Provavelmente o efeito antimetabólico do 5-FU é mais sentido pelas células desta região, local onde se inicia a epitelização corneana após ulceração⁽¹⁰⁾.

A possibilidade do efeito observado se tratar de ação citostática ou tóxica poderá ser esclarecida no futuro, por meio de estudos de quantificação de proliferação celular e apoptose, usando imunohistoquímica, conforme métodos anteriormente descritos^(7-8,10).

CONCLUSÃO

Os achados deste estudo nos permitem concluir que o 5-FU é um agente que também lesa o epitélio corneano íntegro e que os efeitos deletérios se relacionam com a concentração da droga, sendo mais intensos na periferia da córnea.

ABSTRACT

Purpose: To assess the influence of the antiproliferative agent (5-FU) on the intact rabbit corneal epithelium. **Methods:** 10 rabbits (14 eyes), were divided into: control group (CG), 4 eyes without drug administration; G1, 5 eyes underwent treatment with topical 12.5 mg/ml 5-fluorouracil and G2, 5 eyes received 5-fluorouracil in the concentration of 25 mg/ml. Topical 5-fluorouracil was administered four times daily for 7 days. Then the animals were sacrificed, the cornea was removed and fixed in 2% glutaraldehyde solution and the corneal specimens were prepared for scanning electron microscopy (SEM). **Results:** CG: the corneal surface in normal rabbits are composed of characteristic flat polygonal cell arranged in a mosaic pattern, in which light, dark and intermediate cells were distinguishable. Light cells have the most numerous microprojections. The crypts were randomly distributed over the surface, one to three were founded on each cell. G1: dark cells were present in a higher number than white cells, with a tower number of crypts, surface alterations, exposing the nucleus and desquamative cells. G2: increase of microprojections, disrupted attachments with adjacent cells, decrease in number and variability of crypt size. These alterations appeared mainly at the peripheral cornea. **Conclu-**

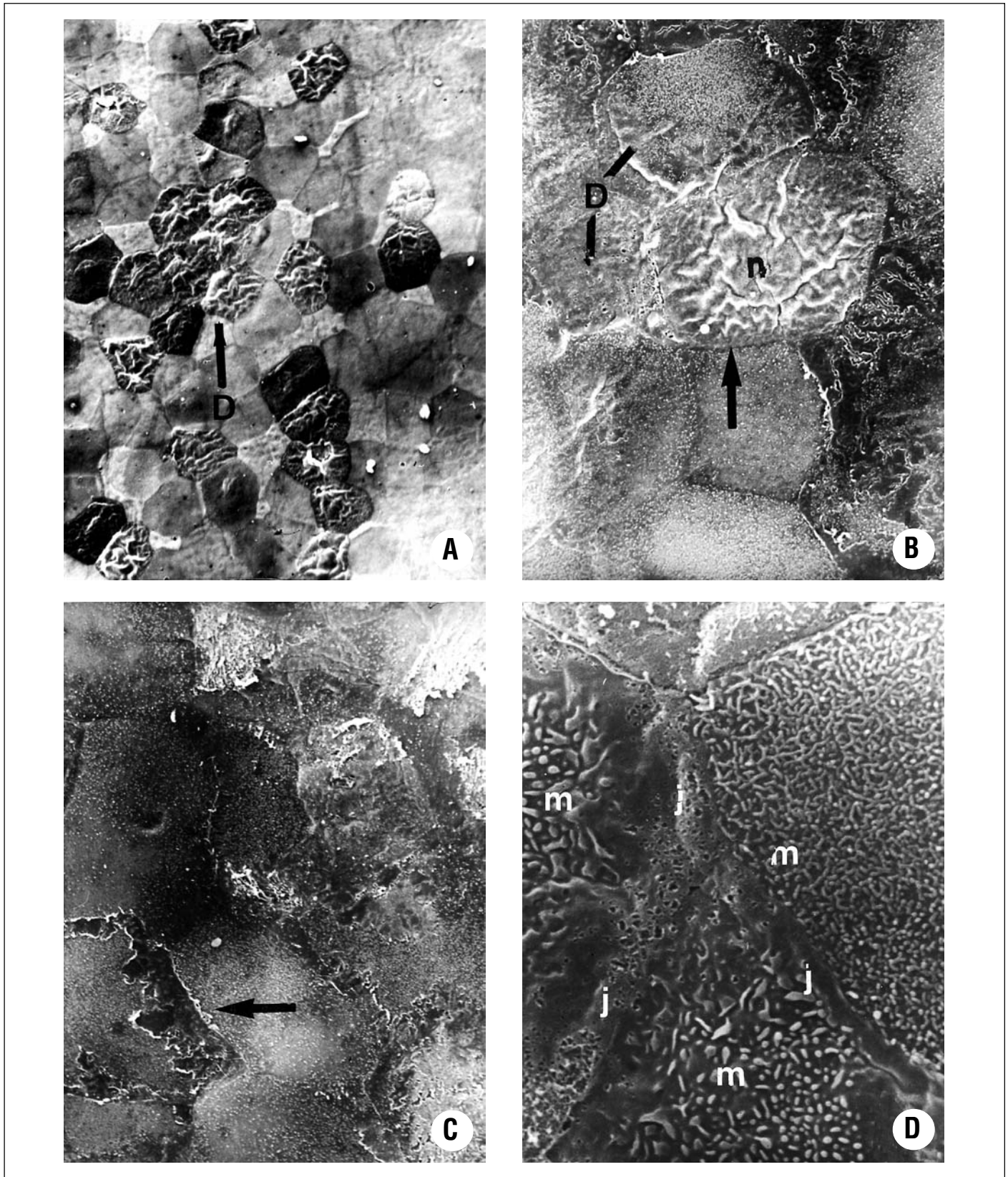


Figura 3 - Epitélio corneano de coelho do G2. A: Descamação de células epiteliais (D-) e criptas (seta) (405x); B: Grandes dobras na superfície celular (seta), protusão do núcleo (n) e descamação epitelial (D-) (1110x); C: Descamação de células epiteliais que se iniciou na área de união entre células (seta) e progrediu em direção ao centro (1110x); D: Modificações nas junções intercelulares (j) e aumento de microprojeções na superfície celular (m) (5040x)

Quadro 1. Avaliação semi-quantitativa das alterações do epitélio corneano do coelho com uso tópico de 5-fluorouracil

| | G C | G 1 | G 2 |
|---------------------|--------|-----|-----|
| Criptas | | | |
| >periferia | 2*/2** | 2/5 | 3/5 |
| =periferia e centro | 0/2 | 3/5 | 1/5 |
| >centro | 0/2 | 0/5 | 1/5 |
| Microplacas | | | |
| Cel clara | 2/2 | 5/5 | 5/5 |
| Cel escura | 0/2 | 1/5 | 5/5 |
| Descamação | | | |
| Periferia | 0/2 | 0/5 | 3/5 |
| Centro e periferia | 1/2 | 3/5 | 1/5 |
| Centro | 0/2 | 0/5 | 1/5 |

*nº de animais que apresentaram a característica; **nº total de animais

sion: 5-fluorouracil caused discernible changes in the intact rabbit cornea. These changes were more evident in eyes which received the drug at a higher concentration, and appeared mainly at the peripheral cornea.

Keywords: Fluorouracil/administration & dosage; Cornea/ultrastructure; Epithelium, corneal/ultrastructure; Microscopy, electron, scanning; Rabbits; Ophthalmic solutions

REFERÊNCIAS

- Yeatts RP, Engelbrecht NE, Curry CD, Ford JG, Walter KA. 5-fluorouracil for the treatment of intraepithelial neoplasia of the conjunctiva and cornea. *Ophthalmology* 2000;107:2109-5.
- Schellini SA, Shiratori CN, Spirandelli PH, Shiratori CA, Padovani CR. Uso do 5-fluorouracil no intra-operatório da cirurgia de pterígio. *Arq Bras Oftalmol* 2000;63:111-4.
- Barbarini LC, Schellini SA, Marques MEA. Efeitos da aplicação tópica de 5-fluorouracil no limbo córneo-escleral de coelhos [abstract]. *Arq Bras Oftalmol* 1999;62:409.
- Silveira M. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: Souza W de, editor. *Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia 1998. p.33-7.
- Thermes F, Molon-Noblot S, Grove J. Effects of acetylcysteine on rabbit conjunctival and corneal surfaces. A scanning electron microscopy study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2958-63.
- Pawley J. The development of field-emission scanning electron microscopy for imaging biological surfaces. *Scanning* 1997;19:324-36.
- Ando H, Ido T, Kawai Y, Yamamoto T, Kitazawa Y. Inhibition of corneal epithelial wound healing- a comparative study of mitomycin C and 5-fluorouracil. *Ophthalmology* 1992;99:1809-14.
- Keizer RJ de, Wolff-Rouendaal D, Van Delft JL. Topical application of 5-fluorouracil in premalignant lesions of cornea, conjunctiva and eyelid. *Doc Ophthalmol* 1986;64:31-42.
- Kenyon KR. Anatomy and pathology of ocular surface. *Int Ophthalmol Clin* 1979;19:3-35.
- Parente DR, Silva MRBM, Silva Junior RG, Marques MA. Modelos experimentais de deficiência limbar em coelhos: análise clínica. *Arq Bras Oftalmol* 2002;65:153-60.

Encontro Anual da Association for Research in Vision and Ophthalmology - ARVO

25 a 30 de abril de 2.004

Fort Lauderdale - Flórida - EUA

INFORMAÇÕES: E-mail: arvo@arvo.org

Home page: www.arvo.org