

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA PER-OPERATÓRIA
DA MITOMICINA C, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES,
SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE MIOPLASTIAS DO RETO
DORSAL DO BULBO DO OLHO DE COELHOS**

Fabício Villela Mamede

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA PER-OPERATÓRIA
DA MITOMICINA C, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES,
SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE MIOPLASTIAS DO RETO
DORSAL DO BULBO DO OLHO DE COELHOS**

Fabício Villela Mamede

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2007

M264e Mamede, Fabrício Villela
Efeitos da administração tópica per-operatória da mitomicina C,
em diferentes concentrações, sobre a cicatrização de mioplastias do
reto dorsal do bulbo do olho de coelhos / Fabrício Villela Mamede. --
Jaboticabal, 2007
xii, 67 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007
Orientador: José Luiz Laus
Banca examinadora: Geórgia Nadalini Rodrigues, Aline Adriana
Bolzan, Cíntia Lúcia Maniscalco, Júlio Carlos Canola
Bibliografia

1. Olho. 2. Aderência. 3. Mitomicina C. 4. Mioplastia. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619: 617.761:636.92

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FABRÍCIO VILLELA MAMEDE, nascido em Ribeirão Preto, no dia 15 de junho de 1976, iniciou o ensino fundamental em 1983, finalizando-o em 1990. Na seqüência, iniciou o ensino médio, concluindo-o em 1993. A partir de 1995, dedicou-se aos estudos da Medicina Veterinária, tendo se formado pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, em 1999. Dedicou-se, durante o ano de 2000, ao aprimoramento da Medicina Veterinária, em especial à Oftalmologia Veterinária, tendo realizado estágio nos serviços de Oftalmologia Veterinária da USP-SP e UNESP-Jaboticabal. Em fevereiro de 2001, iniciou o Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Cirurgia Veterinária, pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Campus de Botucatu, tendo como área de pesquisa a Oftalmologia Veterinária, com ênfase na reparação da musculatura extra-ocular. Em fevereiro de 2003, finalizou sua dissertação e, ato contínuo, iniciou o Doutorado em Cirurgia Veterinária, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Seus estudos mantiveram-se na mesma linha de pesquisa, como forma de responder às indagações advindas do Mestrado.

AGRADECIMENTOS

À **Karina Pontin Mamede**, minha esposa, pela orientação no fracionamento do fármaco, pelo companheirismo, ajuda e compreensão nos momentos difíceis.

À minha família, pela orientação, confiança e apoio durante a minha vida.

Ao **Prof. Dr. José Luiz Laus**, meu orientador, pelos ensinamentos, amizade e compreensão nos momentos difíceis.

Aos Médicos Veterinários e amigos **Bianca, Letícia e Adriana** pelas idéias, colaborações e companheirismo durante o experimento.

Ao **Prof. Dr. Edson Garcia Soares**, do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela valiosa contribuição no estudo de microscopia óptica e imunoistoquímica.

Ao **Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque**, do Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pela colaboração nos estudos morfométricos.

À **Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni**, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal, pela colaboração nos estudos da quantificação fibroblástica.

Ao **Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira**, do Departamento de Ciências Exatas da FCAV – UNESP – Jaboticabal, pela análise estatística dos resultados.

À todos da “Equipe de Oftalmologia” de Jaboticabal pela minha formação em Oftalmologia Veterinária.

À **FAPESP**, pela bolsa e fomento à pesquisa, durante o período de março de 2004 à agosto de 2006 - Processo 03/09527-0.

À **Fundunesp**, pelo fomento para a realização da imunoistoquímica.

À **Capes**, pela bolsa de pesquisa, durante o período de outubro de 2003 à fevereiro de 2004.

À todos os professores, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV - UNESP - Jaboticabal, que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

À Supervisão e corpo de funcionários do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV – UNESP – Jaboticabal.

Aos funcionários da Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pelo fornecimento dos coelhos destinados à pesquisa.

Aos coelhos utilizados no experimento, cuja colaboração involuntária foi primordial para a pesquisa.

Enfim, ... agradeço a todos que de forma direta ou indireta, contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	xi
SUMMARY	xii
I. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
II. MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1 Aspectos éticos	7
2.2 Animais	7
2.3 Grupos experimentais	8
2.4 Manipulação e fracionamento da MMC	9
2.5 Procedimentos em anestesia	9
2.6 Instrumentais cirúrgicos	10
2.7 Fios de suturas e outros materiais	10
2.8 Procedimentos de profilaxia	11
2.9 Técnica operatória	11
2.10 Pós-operatório	14
2.11 Avaliação clínica	14
2.12 Avaliação das aderências	14
2.13 Microscopia de luz	15
2.14 Morfometria	15
2.15 Imunoistoquímica	16
2.16 Análise à estatística	18
III. RESULTADOS	19
3.1 Avaliação clínica	19
3.2 Avaliação das aderências	28
3.3 Microscopia de luz	35
3.4 Morfometria	41
3.5 Imunoistoquímica	52
IV. DISCUSSÃO	54
V. CONCLUSÕES	59
VI. REFERÊNCIAS	60

LISTA DE ABREVIATURA

0,008%	Grupo Tratado com Mitomicina C à 0,008%
0,02%	Grupo Tratado com Mitomicina C à 0,02%
0,04%	Grupo Tratado com Mitomicina C à 0,04%
Complexo ABC	Streptavidina
DAB	Diaminobenzidine
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
FGF-2	Fator de Crescimento Fibroblástico básico
GCN	Grupo Controle Negativo
GCP	Grupo Controle Positivo
HE	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O ₂	Água Oxigenada
HGF	Fator de Crescimento dos Hepatócitos
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IL	Interleucina
Imuno	Imunoistoquímica – FGF-2
MMC	Mitomicina C
PBS	Solução Salina Tamponada
PDGF	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
TGF	Fator de Crescimento Transformante
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
Tric	Tricrômico de Masson

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Olhos de coelhos acometidos por quemose, do 1° ao 120° dias da avaliação, nos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%	20
Tabela 2. Olhos de coelhos acometidos por blefarospasmo, do 1° ao 120° dias da avaliação, nos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%	23
Tabela 3. Olhos de coelhos acometidos por hiperemia conjuntival, do 1° ao 120° dias da avaliação, nos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%	25
Tabela 4. Olhos de coelhos acometidos por secreção mucosa, do 1° ao 120° dias da avaliação, nos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%	27
Tabela 5. Olhos de coelhos que exibiram aderências aos 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo GCN	29
Tabela 6. Olhos de coelhos que exibiram aderências aos 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo GCP	30
Tabela 7. Olhos de coelhos que exibiram aderências aos 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo 0,008%	30
Tabela 8. Olhos de coelhos que exibiram aderências aos 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo 0,02%	30
Tabela 9. Olhos de coelhos que exibiram aderências aos 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo 0,04%	31
Tabela 10. Olhos de coelhos que exibiram ou não aderências ao 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo GCN	32
Tabela 11. Olhos de coelhos que exibiram ou não aderências ao 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo GCP	32
Tabela 12. Olhos de coelhos que exibiram ou não aderências ao 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo 0,008%	33

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 13. Olhos de coelhos que exibiram ou não aderências ao 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo 0,02%	33
Tabela 14. Olhos de coelhos que exibiram ou não aderências ao 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo 0,04%	34
Tabela 15. Média dos valores dos núcleos das fibras musculares do músculo reto superior de olhos de coelhos, aos 15 dias da avaliação	42
Tabela 16. Média dos valores dos núcleos das fibras musculares do músculo reto superior de olhos de coelhos, aos 30 dias da avaliação	42
Tabela 17. Média dos valores dos núcleos das fibras musculares do músculo reto superior de olhos de coelhos, aos 60 dias da avaliação	43
Tabela 18. Média dos valores dos núcleos das fibras musculares do músculo reto superior de olhos de coelhos, aos 120 dias da avaliação	43
Tabela 19. Média dos valores do quantitativo de fibroblastos e desvio padrão, das áreas adjacentes às mioplastias do reto dorsal de coelhos, do 15° ao 120° dias da avaliação	51

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Imagens fotográficas ilustrando recuo do músculo reto dorsal em olhos de coelhos. A - observa-se incisão da conjuntiva bulbar, entre 11 e 14 horas de um relógio. B - notam-se os músculos reto dorsal e oblíquo dorsal. C - transfixação do músculo reto dorsal para posterior recuo do mesmo. D - secção do músculo reto dorsal. E - aferição, com compasso cirúrgico, do recuo do músculo reto dorsal. F - sutura mioescleral. G - aplicação de cotonete embebido com solução fisiológica ou com mitomicina C. H - aspecto final da intervenção cirúrgica</p>	13
<p>Figura 2. Imagens fotográficas ilustrando olhos de coelhos, em diferentes dias de pós-operatório. A - observa-se, ao 1º dia, intensa hiperemia conjuntival e moderada quemose. B - nota-se, aos 5 dias, moderada hiperemia conjuntival e discreta quemose. C - aos 10 dias, observa-se discreta hiperemia conjuntival. D e E - observa-se, aos 60 e 120 dias, ausência de alterações clínicas visibilizáveis</p>	21
<p>Figura 3. Representação gráfica da comparação entre os grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, pela mediana dos graus de quemose, do 1º ao 60º dias da avaliação, em olhos de coelhos</p>	22
<p>Figura 4. Representação gráfica da comparação entre os grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, pela mediana dos graus de blefarospasmo, do 1º ao 60º dias da avaliação, em olhos de coelhos</p>	24
<p>Figura 5. Representação gráfica da comparação entre os grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, pela mediana dos graus de hiperemia conjuntival, do 1º ao 60º dias da avaliação, em olhos de coelhos</p>	26
<p>Figura 6. Representação gráfica da comparação entre os grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, pela mediana dos graus de secreção, do 1º ao 60º dias da avaliação, em olhos de coelhos</p>	28

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 7. Representação gráfica da comparação entre os grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, pela mediana do quantitativo de aderência do 1° ao 120° dias de pós-operatório, em olhos de coelhos	31
Figura 8. Representação gráfica da comparação entre os grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, pela mediana do grau de aderência, do 1° ao 120° dias da avaliação, em olhos de coelhos	34
Figura 9. Fotomicrografias de áreas adjacentes às mioplastias do reto dorsal de coelhos, nos diferentes grupos e períodos. A - 15 dias (GCP): observa-se intenso processo inflamatório granulomatoso entre o músculo, com presença do fio de sutura. B - 30 dias (GCP): persiste o intenso processo inflamatório granulomatoso e o granuloma, com intensa proliferação linfocitária. C - 60 dias (0,02%): nota-se diminuição da reação granulomatosa e do granuloma entre a esclera e o músculo. D - 120 dias (0,02%): observa-se a persistência do granuloma e fibrose	39
Figura 10. Fotomicrografias de áreas adjacentes às mioplastias do reto dorsal de coelhos, nos diferentes grupos e períodos. A - 15 dias - 0,008%: observa-se intensa fibrose entre o músculo e a esclera. B - 30 dias - GCP: denota-se fibrose moderada ao redor do granuloma e entre as fibras musculares. C - 60 dias - 0,04%: nota-se, discreta fibrose entre a esclera e os granulomas. D - 120 - 0,02%: denota-se fibrose moderada entre o músculo, o granuloma e a esclera	40
Figura 11. Representação gráfica da comparação entre os grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, pela mediana do volume nuclear, do 15° ao 120° dias da avaliação, em olhos de coelhos	44
Figura 12. Representação gráfica da comparação entre os grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, pela mediana da área nuclear, do 15° ao 120° dias da avaliação, em olhos de coelhos	45

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 13. Representação gráfica da comparação entre os grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, pela mediana do perímetro nuclear, do 15° ao 120° dias da avaliação, em olhos de coelhos	46
Figura 14. Representação gráfica da comparação entre os grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, pela mediana da relação volume / área nuclear, do 15° ao 120° dias da avaliação, em olhos de coelhos	47
Figura 15. Representação gráfica da comparação entre os grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, pela mediana da excentricidade nuclear, do 15° ao 120° dias da avaliação, em olhos de coelhos	48
Figura 16. Representação gráfica da comparação entre os grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, pela mediana do coeficiente de forma nuclear, do 15° ao 120° dias da avaliação, em olhos de coelhos	49
Figura 17. Representação gráfica da comparação entre os grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, pela mediana do índice de contorno nuclear, do 15° ao 120° dias da avaliação, em olhos de coelhos	50
Figura 18. Representação gráfica da comparação entre os grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, da quantidade de fibroblastos, do 15° ao 120° dias da avaliação, em olhos de coelhos	52
Figura 19. Fotomicrografias de áreas adjacentes às mioplastias do reto dorsal de coelhos, nos diferentes grupos e períodos. A - 15 dias - GCN: observa-se expressão moderada do FGF-2 em macrófago. B - 30 dias - 008%: denota-se moderada marcação do FGF-2 em macrófago e fibroblastos. C - 60 dias - 0,02%: nota-se a expressão do FGF-2 variando de discreta à moderada, notadamente, em macrófagos. D - 120 dias 0,04%: este animal apresenta marcação discreta em fibroblastos	53

RESUMO

Mioplastias extra-oculares podem ensejar aderências entre o músculo operado e os tecidos adjacentes, produzindo, não raro, estrabismos cicatríciais. Com intuito de se minimizar a ocorrência de aderências, investigaram-se os efeitos da mitomicina C (MMC), um antifibrótico, em concentrações ascendentes de 0,008, 0,02 e 0,04%, aplicada no per-operatório de mioplastias do reto dorsal do bulbo do olho de coelhos. Para tal, foram operados 56 animais, os quais foram divididos em sete grupos. Para o pós-operatório, instituíram-se limpeza com solução fisiológica das áreas operadas, profilaxia antimicrobiana e antiinflamatória, na forma de colírio. Procederam-se avaliações clínica, histológica, morfométrica e quanto à imunistoquímica, em que se estudou o Fator de Crescimento Fibroblástico-básico (FGF-2). Encontraram-se, clinicamente, mais aderências nos olhos controle, comparativamente aos tratados, no entanto, sem significação estatística ($p > 5\%$). À histologia, verificou-se que a MMC ensejou retardo da cicatrização junto às áreas das mioplastias, notadamente no grupo que a recebeu, à concentração de 0,02%. A imunistoquímica revelou marcação do FGF-2 em fibroblastos e macrófagos, indistintamente, entre os grupos. Com base nos resultados, permite-se admitir que a MMC, nas concentrações em que fora empregada, foi capaz de retardar a cicatrização e, por conseguinte, o estrabismo secundário, sem ensejar efeitos colaterais.

Palavras chave: aderência, mitomicina C, mioplastia, olho.

SUMMARY

Extraocular myoplasties may cause adhesions to adjacent tissues, resulting cicatricial strabismus. With the purpose of reducing to a minimum the occurrence of adhesion, we studied the effects of mitomycin C (MMC), an antifibrotic, in concentrations of 0,008%, 0,02%, and 0,04% applied during intraoperative of myoplasties of the superior rectus muscle of laboratory albino rabbits. Fifty six animals were operated on and were divided in seven groups. During the postoperative the operated areas were cleaned with physiological solution. Eyedrop instillation to prevent inflammation and bacterial infection were used. The method to analyze the results consisted of clinical and histological evaluation and statistical analyzes. We also evaluated at the same time the amount of basic fibroblast growth factor (FGF-2) by immunohistochemical study. Clinically we found more adhesions in the eyes of the control group than in the groups of treated eyes. However there was no significant statistics difference between the two groups ($p>5\%$). Histologically we found that MMC caused a delayed cicatrization in the mioplastic areas, specially in the group who received the 0,02% concentration. The immunohistochemical showed FGF-2 marking in fibroblasts and macrophages, but between the groups there wasn't no difference. Based on those results we conclude that MMC in the utilized concentrations was capable of delaying the cicatrization and consequently avoid the secondary strabismus without undesirable side effects.

Key words: adhesions, mitomycin C, myoplasty, eye.

I. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O estrabismo no homem, assim como nos animais, possui como causas principais às de origem congênita, traumática e pós-cirúrgicas. É crescente o número de animais que manifestam o estrabismo, como por exemplo, as de origem congênitas, representado pelos gatos da raça Siamês, bem como os cachorros da raça Pug. As de origem traumática, como nos casos de proptose do globo ocular, não são, na maioria das vezes, reparadas pelos veterinários. Frente às adversidades encontradas para a realização da mioplastia dos músculos extra-oculares, bem como a falta de interesse dos proprietários em se reparar o estrabismo, pouco se sabe, na veterinária, à despeito do estrabismo pós-cirúrgico. No entanto, esta condição é factível de ser manifestada nos animais, assim como no homem.

Mioplastias extra-oculares, não raro, ensejam aderências entre o músculo operado e os tecidos adjacentes, permitindo a ocorrência de disfunções oculomotoras e do estrabismo cicatricial. As aderências, habitualmente, formam-se entre o músculo que teve sua bainha seccionada e a superfície escleral ou conjuntival, bem como com a cápsula de Tenon ou a gordura orbitária (CRUZ, 1996). Sua gênese decorre, notadamente, da proliferação fibroblástica e da biosíntese do colágeno e da matriz extracelular (MAHINDRAKAR et al., 2001).

Diferentes procedimentos e condutas têm sido propostos como ações profiláticas frente às aderências pós-cirúrgicas. Destacam-se o emprego de barreiras físicas, tais como uso de esponja gelatinosa de pele de animais (LAVAL, 1958; SILVA, 1983), polipeptídeos sintéticos (ELSAS et al., 1992), materiais à base de polyglactina 910 (HWANG & CHANG, 1996), substâncias viscoelásticas, cápsula de Tenon e silicone (BROOKS et al., 1996). Bem como, utilização de agentes anticicatriciais, como a *daunorubicin*, a bleomicina, a mitramicina (LEE et al., 1990), o 5-fluoracil (YAMAMOTO et al., 1990; HWANG & CHANG, 1999), o cianoacrilato (BROOKS et al., 1996) e a MMC (CRUZ, 1996), os quais minimizam a ocorrência de cicatrizes pós-traumáticas.

A MMC foi, pioneiramente, isolada por WAKAKI et al. (1958) a partir da fermentação do *Streptomyces caespitosus*. De estrutura química complexa, tem seu peso molecular da ordem de 334,33. Pertencente ao grupo dos antibióticos e antineoplásicos, ela mostrou-se capaz de inibir a síntese do DNA, do RNA e de proteínas, atuando sobre a proliferação fibroblástica. Mostrou-se, ainda, efetiva na degradação do DNA pré-formado e na lise do núcleo celular (CROOKE & BRADNER, 1976). Muito utilizada em protocolos quimioterápicos, teve, no passado, seu emprego como agente antibiótico abandonado, face à sua toxicidade (ZIMMERMAN et al., 1997).

Em oftalmologia, a MMC foi pela primeira vez utilizada por KUNITOMO & MORI (1969) na prevenção de recidivas pós-operatórias do pterígio. LEE et al. (1990) e YAMAMOTO et al. (1990) investigaram-na, “*in vitro*”, quanto aos seus efeitos anticicatriciais no tecido subconjuntival e confirmaram sua ação retardadora da reparação cicatricial.

Como forma de minimizar a hipertrofia cicatricial sobre a conjuntiva bulbar, a MMC foi utilizada por URBAN & KAUFMAN (1994), na cirurgia do estrabismo. Os autores empregaram-na por via tópica, em concentrações de 0,02 e 0,04%, a intervalos de 6 horas, e obtiveram menor cicatriz conjuntival. CRUZ (1996) utilizou-a sobre a musculatura extrínseca do bulbo do olho de coelhos, por 5 minutos, embebida em esponja de celulose, à concentração de 0,02%; decorridas seis semanas da intervenção cirúrgica, foram observadas menos aderências junto às áreas próprias e adjacentes ao músculo operado. MAHINDRAKAR et al. (2001) utilizaram-na sob condições similares, em indivíduos da espécie humana, e asseguraram sua eficácia na prevenção de aderências.

MAMEDE et al. (2004) instilaram-na, na concentração de 0,04%, no pós-operatório da mioplastia do reto medial de coelhos, a intervalos regulares de 6 horas, por 14 dias ininterruptos, e observaram, macro e microscopicamente, menor aderência em áreas adjacentes às das intervenções cirúrgicas.

Não obstante à constatação, por muitos, dos bons resultados, houve quem contestasse a eficácia da MMC como agente antifibrótico. BROOKS et al. (1996), OHTSUKI et al. (1997) e MINGUINI et al. (2000) reportaram-se a achados

insatisfatórios ao empregarem-na na profilaxia da fibrose em cirurgia oftálmica. BROOKS et al. (1996) e MINGUINI et al. (2000) testaram-na no per-operatório da cirurgia do estrabismo, a uma concentração de 0,05 e 0,04%, respectivamente, e não observaram efeitos antifibrótico da MMC.

Efeitos colaterais relatados com utilização da MMC na oftalmologia, foram: desconforto ocular, fotofobia persistente, hiperemia conjuntival e quemose, retardo na cicatrização da conjuntiva, granuloma conjuntival, ceratite puntiforme, edema, “*melting*” e perfurações corneais, zonas de calcificação escleral, irites, glaucoma secundário e catarata (RUBINFELD et al., 1992; ANDUZE & BURNETT, 1996; DOUGHERTY et al., 1996; HELAL et al., 1996; MANNING et al., 1997; RUBINFELD & STEIN, 1997; TSAI et al., 2002; SAFIANIK et al., 2002; DADEYA & FATIMA, 2003; MAMEDE et al., 2004).

Após cirurgias corretivas do estrabismo, URBAN & KAUFMAN (1994) observaram quadros de ceratite superficial em alguns olhos que receberam MMC. MAMEDE et al. (2004) verificaram que a MMC à 0,04%, instilada por 14 dias ininterruptos, ensejava hiperemia conjuntival, quemose e secreção ocular do tipo mucosa. À microscopia, identificaram maior exsudação inflamatória, do tipo granulomatosa não específica.

MATTAR et al. (1995) informaram que a ação da MMC restringe-se ao local de sua aplicação, ao observarem que, quando administrada sobre a esclera, por 5 minutos, no per-operatório, ela não interferia com a reparação cicatricial da córnea. CARONES et al. (2002) sugeriram que a MMC possui ação duradoura sob a área aplicada, uma vez que, quando administrada no per-operatório de ceratectomias fotorrefrativas, ela foi capaz de diminuir o leucoma cicatricial no terceiro mês da sua aplicação.

Quanto à sua farmacocinética, estudos apontam que a concentração da MMC, após aplicação tópica, varia de 10 à 11,8 ng/ml, se utilizada em soluções de 0,2 à 1,0 mg/ml, por 5 minutos. No entanto, ao irrigar o local da aplicação, com solução fisiológica, a concentração diminui à metade. Sua meia-vida é considerada curta, entre 10 e 27 minutos, dependendo do tecido aplicado. Estudos apontam para sua permanência por até 72 horas, quando aplicada na concentração de 0,2 mg/ml

(KAWASE, et al., 1992; SANDERSON & SHIELD, 1996; SCHRAERMAYER et al., 1999).

Segundo CORDEIRO et al. (1999), a MMC administrada pela via subconjuntival diminui a concentração de macrófagos, linfócitos, fibroblastos, da matriz extracelular e dos colágenos do tipo I e III no leito da aplicação e em áreas próximas.

Estudos conduzidos à microscopia eletrônica mostraram danos ultra-estruturais ao corpo ciliar, após administração subconjuntival da MMC em coelhos. A administração de quantidades superiores a 0,1 mg ensejou ao epitélio a formação de vacúolos intracitoplasmáticos e aumento dos espaços intra e extracelular no corpo ciliar. Os achados, inéditos à época, mostraram que a MMC, quando aplicada na câmara vítrea, é deletéria ao corpo ciliar (HEAPS et al., 1998).

ALVES et al. (1996) avaliaram, à morfometria, o epitélio corneal de coelhos após instilarem a MMC nas concentrações de 0,008, 0,02 e 0,04%, a intervalos regulares de 12 horas, por 4 dias consecutivos. Identificaram alterações estruturais, notadamente epiteliais, quanto ao número de núcleos, relação núcleo-citoplasma e área celular. Observaram, ainda, que a MMC, em contato com áreas desepitelizadas da córnea, retardava a sua reparação epitelial.

OH et al. (1999) estudaram, à imunoistoquímica, os efeitos da MMC à 0,05%, sobre a musculatura extra-ocular e verificaram menor expressão do Fator de Crescimento Fibroblástico básico (FGF-2) em coelhos que a receberam. O FGF-2 possui capacidade de acelerar a cicatrização de feridas cutâneas e musculares (KASEMKIJWATTANA, et al., 2000; OBARA et al., 2005).

Estudos apontaram para as vantagens da MMC, em concentrações menores, nas cirurgias do glaucoma e pterígio, e que em baixas concentrações, os efeitos indesejáveis sobre o globo ocular eram amenizados. MITRE et al. (1996) recomendaram empregá-la em concentrações de 0,01, 0,02 e 0,04%, uma vez que, quando administrada na câmara vítrea, ela é capaz de proporcionar menores danos às estruturas adjacentes.

CORDEIRO et al. (1999) propuseram empregar o Fator de Crescimento Transformante β_2 (TGF- β_2), por via tópica, visando a inibir os efeitos antifibróticos da MMC, uma vez que, "in vitro", o TGF- β_2 foi capaz de estimular a cicatrização conjuntival.

A reparação da musculatura extra-ocular ocorre de consoante com a tríade de eventos dos tecidos vascularizados (exsudação, proliferação e retração), cujas fases são inter-relacionadas e tempo dependentes. A fase exsudativa inicia-se imediatamente ao trauma, a proliferativa, entre a 1^o e 3^o semanas e a de retração, entre a 2^o e a 3^o semanas (HUARD et al., 2002).

Após uma lesão muscular, o trauma mecânico destrói a integridade da membrana plasmática e da lâmina basal, o que proporciona o influxo de cálcio para as fibras musculares que sofrem necrose por autodigestão, e, rapidamente, edemaciação. A área necrosada é invadida por pequenos vasos sangüíneos e células mononucleares, macrófagos e linfócitos T ativados. Linfócitos secretam várias citocinas e fatores de crescimento, tais como: IL-1, IL-6, IL-8, FNT- α , IGF-1, HGF, EGF, TGF, PDGF e FGF. As interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), bem como o FNT- α aumentam o fluxo sangüíneo, a permeabilidade capilar e aceleram a resposta inflamatória local. Os fatores de crescimento, tais como, IGF-1, HGF, EGF, TGF e PDGF regulam a diferenciação e a proliferação das fibras musculares durante a regeneração muscular. Células satélites, influenciadas pela lesão muscular e por fatores de crescimento, são ativadas, proliferam-se e diferenciam-se em miotubos ou fibras musculares regeneradas (HUARD et al., 2002).

A migração de fibroblastos para o local da lesão e sua subsequente proliferação são deflagradas por fatores de crescimento, TGF, PDGF, EGF, por citocinas IL-1 e FNT e, notadamente, pelo FGF. Reconhecem-se, atualmente, 10 tipos de FGF, os quais podem ser encontrados no citoplasma, na superfície das células e na matriz extracelular. Eles são produzidos por células inflamatórias, principalmente, por macrófagos, fibroblastos, mastócitos, linfócitos T e por células endoteliais. Os FGF mais estudados são os FGF-1 e FGF-2, os quais estimulam a angiogênese e reparação cicatricial. O FGF-2 relaciona-se ao controle da migração de células no local da lesão, à

formação de novos vasos, à proliferação de células reparadoras e à tubulogênese (BIKFALVI, et al., 1997; FUNATO, et al. 1999; KAWAI et al. 2005; KUMAR et al., 2005).

Concebeu-se estudar a MMC, em concentrações ascendentes de 0,008, 0,02 e 0,04 %, como agente antifibrótico, no per-operatório da cirurgia do recuo do músculo reto dorsal de coelhos albinos de laboratório. Outrossim, avaliaram-se efeitos colaterais, notadamente os morfométricos, sobre as áreas próprias às intervenções cirúrgicas.

Para a obtenção de dados conclusivos às proposições, conduziram-se estudos por métodos clínicos e à macro, meso e microscopias, levando-se em conta, ainda, a morfometria e a imunoistoquímica.

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

Anteriormente à realização da pesquisa, o projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Ressalta-se que se obedeceram, ainda, às normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology - ARVO (National Institutes of Health Publications No 85-23: Revised 1985)* (ARVO, 1985) e do Código de Nüremberg (GOLDIM, 1995).

2.2 Animais

Utilizaram-se 56 animais da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus*, LILLJEBORG, 1874), da raça Nova Zelândia, adultos, machos ou fêmeas, com peso superior a 2 Kg, fornecidos pela Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Para obtenção de grupos homogêneos, com animais hígidos, os coelhos foram previamente examinados por semiotécnica fundamentada na biomicroscopia com lâmpada de luz em fenda¹, tonometria de aplanção² e na oftalmoscopia binocular indireta³. Uma vez selecionados, os animais foram identificados e mantidos, individualmente, em gaiolas medindo 70 x 50 cm, com água potável e ração apropriada⁴ *ad libitum*.

¹ Portable Slit Lamp SL – 14 - Kowa - Tóquio, Japão.

² Tonopen XL – Mentor O & O - Norwell, MA, USA.

³ Oftalmoscópio Binocular Indireto, modelo OH-4.2, com câmera colorida – Eyetec - São Carlos, SP, Brasil.

⁴ Fri-Coelhos RL – Fri-Ribe - Pitangueiras, SP, Brasil.

2.3 Grupos experimentais

Compuseram-se sete grupos, compostos por oito indivíduos. Para minimizarem-se os efeitos de variações individuais e aumentarem-se as amostras, ambos os olhos de cada animal foram empregados na consecução da pesquisa, à exceção do grupo controle negativo, exatamente por se tratar de um controle.

Os olhos operados foram submetidos ao recuo, de cinco a oito mm, do músculo reto dorsal e, imediatamente a ele, ao contato sobre a sutura mioescleral, durante 5 minutos, de cotonete embebido com solução fisiológica à 0,9% ou de MMC, nas diferentes concentrações, de acordo com seu grupo:

2.3.1 Grupo Controle Negativo (GCN):

Apenas o olho direito foi operado e administrou-se solução fisiológica à 0,9%.

2.3.2 Grupo Controle Positivo x MMC à 0,008% (GCP x 0,008%):

Ambos os olhos foram operados, sendo olho direito submetido à administração de solução fisiológica à 0,9% e seu adelfo de MMC à 0,008%.*

2.3.3 Grupo Controle Positivo x MMC à 0,02% (GCP x 0,02%):

Ambos os olhos foram operados, sendo olho direito submetido à administração de solução fisiológica à 0,9% e seu adelfo de MMC à 0,02%.*

2.3.4 Grupo Controle Positivo x MMC à 0,04% (GCP x 0,04%):

Ambos os olhos foram operados, sendo olho direito submetido à administração de solução fisiológica à 0,9% e seu adelfo de MMC à 0,04%.*

2.3.5 Grupo MMC à 0,008% x MMC à 0,02% (0,008% x 0,02%):

Ambos os olhos foram operados, sendo olho direito submetido à administração de MMC à 0,008% e seu adelfo de MMC à 0,02%.

* Admitiu-se utilizar a MMC em um dos olhos, ao considerar-se a possibilidade dela atuar, também, no olho não tratado, por absorção e disseminação sistêmica.

2.3.6 Grupo MMC à 0,008% x MMC à 0,04% (0,008% x 0,04%):

Ambos os olhos foram operados, sendo olho direito submetido à administração de MMC à 0,008% e seu adelfo de MMC à 0,04%.

2.3.7 Grupo MMC à 0,02% x MMC à 0,04% (0,02% x 0,04%):

Ambos os olhos foram operados, sendo olho direito submetido à administração de MMC à 0,02% e seu adelfo de MMC à 0,04%.

2.4 Manipulação e fracionamento da MMC

Adquiriu-se a MMC na forma estéril⁵, contendo 5 mg. Para obtenção das concentrações desejadas separaram-se alíquotas de 0,04, 0,1 e 0,2 mg, utilizando-se balança eletrônica⁶, com cinco casas decimais (0,00001 mg). Estas alíquotas foram acondicionadas em frascos estéreis⁷, e no ato cirúrgico, foi realizado sua diluição em 5 ml de água para injeção, obtendo-se assim as concentrações de 0,008, 0,02 e 0,04%, respectivamente.

2.5 Procedimentos em anestesia

Para consecução dos tempos operatórios, os coelhos receberam, em uma única seringa, xilazina⁸ com cetamina⁹, respectivamente a 5 mg/kg e a 25 mg/kg de peso corpóreo, pela via intramuscular profunda (KOHN et al., 1997). Na manutenção do plano anestésico, empregou-se anestesia inalatória com máscara em circuito semi-aberto, valendo-se do halotano¹⁰, como gás volátil. No curso das intervenções, os olhos

⁵ Mitocin 5 mg - Mitomicina C - Bristol-Myers Squibb. - Santo Amaro, SP, Brasil

⁶ Balança eletrônica modelo BP211D – Sartorius - Deutschland, Alemanha.

⁷ Vacutainer sem aditivo – BD - Juiz de Fora, MG, Brasil.

⁸ Virbaxyl 2% - Cloridrato de xilazina – Virbac – São Paulo, SP, Brasil.

⁹ Vetaset – Cloridrato de Quetamina – Fort Dodge – Campinas, SP, Brasil.

¹⁰ Fluothane - Halotano – AstraZeneca – Cotia, SP, Brasil.

foram sistematicamente irrigados com colírio anestésico¹¹ à intervalos regulares de 20 minutos.

2.6 Instrumentais cirúrgicos

Para a implementação dos tempos operatórios, foram empregados:

- 1 pinça hemostática curva, modelo Halstead;
- 1 porta-agulhas, modelo Castroviejo;
- 1 pinça de sutura pequena, reta, modelo Castroviejo;
- 1 pinça de sutura pequena, curva, modelo Castroviejo;
- 3 pinças de conjuntiva;
- 1 tesoura curva de tenotomia, modelo Westcott;
- 1 tesoura para ponto;
- 1 compasso, modelo Castroviejo;
- 3 ganchos de estrabismo, tipo Von Graefe nº 3;
- 3 cubas redondas;
- 4 pinças de campo, modelo Backhaus.

2.7 Fios de sutura e outros materiais

Utilizaram-se fios absorvíveis sintéticos multifilamentados a base de poliglactina 910, de número 6-0, com agulhas atraumáticas de 1/4 de círculo, encastoadas de fábrica¹² (HELVESTON & CALLAHAN, 1976). Empregaram-se, ainda, gazes, cotonetes e seringas estéreis.

¹¹ Anestésico solução oftálmica – Cloridrato de tetracaína e de fenilefrina – Allergan – Guarulhos, SP, Brasil.

¹² Vicryl 6-0 (J544G)– Poliglactina 910 – Ethicon – São José dos Campos, SP, Brasil.

2.8 Procedimentos de profilaxia

Pêlos das áreas circunjacentes à região orbitária foram cortados e a pele tratada com solução de polivinilpirrolidona 1:50. A superfície ocular foi lavada com a mesma substância, a uma concentração de 1:100. Para a proteção do campo operatório, empregou-se campo fenestrado estéril de uso oftálmico.

2.9 Técnica operatória

Tempos cirúrgicos em diérese, hemostasia e síntese, e medidas adjuntas foram as mesmas adotadas por PARKS (1983) que incluíram (Figura 1):

- 1- Exposição e incisão da conjuntiva e da cápsula de Tenon, com auxílio do bisturi, próximas e paralelamente ao limbo, entre 10 e 14 horas correspondentes de um relógio (Figura 1, em A);
- 2- Divulsão romba, com tesoura curva de tenotomia, entre a cápsula de Tenon e a episclera (Figura 1, em A);
- 3- Afastamento do retalho conjuntival e mobilização dos músculos reto e oblíquo dorsais, com gancho de estrabismo (Figura 1, em B);
- 4- Isolamento dos músculos reto dorsal e oblíquo dorsal, com auxílio de pinça e de tesoura de tenotomia. Observe que o músculo reto dorsal localiza-se sobre o oblíquo dorsal;
- 5- Transfixação do músculo reto dorsal com o fio de sutura¹², a 3 mm da sua inserção à esclera (as medidas foram avaliadas com compasso cirúrgico) (Figura 1, em C);
- 6- Secção do músculo reto dorsal, com tesoura modelo Westcott, a 1 mm da sua inserção com a esclera (Figura 1, em D);
- 7- Fixação do músculo reto dorsal à esclera, entre 5 e 8 mm posteriormente à sua inserção original, com o fio de sutura previamente transfixado ao músculo (Figura 1, em E e F);
- 8- Certificação da resistência das suturas, com gancho de estrabismo;

- 9- Aplicação, no local das suturas, de cotonete embebido com solução fisiológica à 0,9% ou com MMC à 0,008, 0,02 ou 0,04%, por 5 minutos (Figura 1, em G);
- 10- Limpeza da área cirúrgica com solução fisiológica à 0,9%;
- 11- Reparação da cápsula de Tenon e da conjuntiva bulbar, valendo-se de sutura em pontos simples separados com fio à base de poliglactina 910¹² (Figura 1, em H).

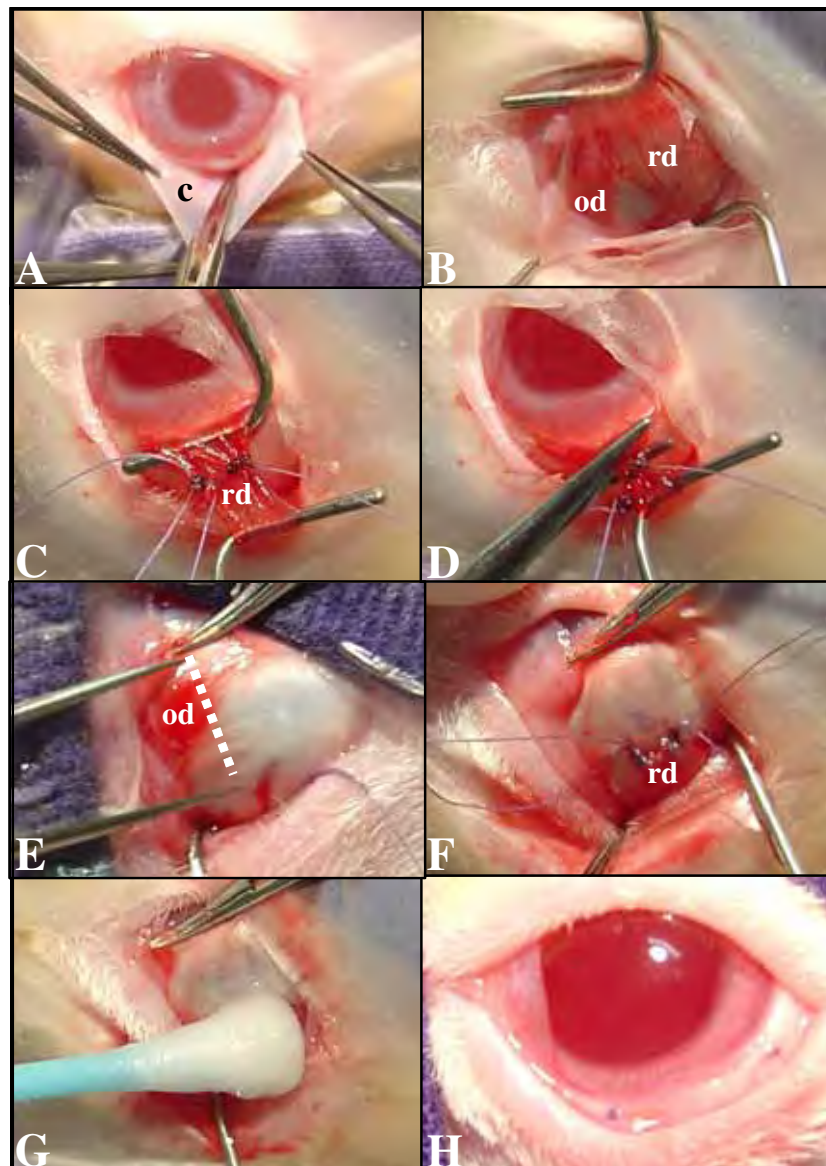


Figura 1. Imagens fotográficas ilustrando o recuo do músculo reto dorsal em olhos de coelhos adultos albinos de laboratório. Em A, observa-se incisão da conjuntiva bulbar (c) entre 10 e 14 horas de um relógio. Em B, notam-se os músculos reto dorsal (rd) e oblíquo dorsal (od). Em C, transfixação do músculo reto dorsal para posterior recuo do mesmo. Em D, secção do músculo reto dorsal. Em E, aferição, com compasso cirúrgico, do recuo do músculo reto dorsal. Em F, sutura mioescleral. Em G, aplicação de cotonete embebido com solução fisiológica ou com MMC à 0,008, 0,02 ou 0,04%. Em H, aspecto final da intervenção cirúrgica. Jaboticabal, SP, 2006.

2.10 Pós-operatório

No pós-operatório, realizaram-se higienização diária da superfície ocular com solução salina à 0,9% e instilação profilática de colírio à base de neomicina, polimixina B e dexametasona¹³, a intervalos regulares de seis horas, por sete dias consecutivos. Para a analgesia, administrou-se cloridrato de buprenorfina¹⁴, na dose de 0,01 mg/kg de peso corpóreo, pela via subcutânea, a intervalos regulares de 12 horas, por cinco dias consecutivos.

2.11 Avaliação clínica

Os animais, segundo os períodos próprios concebidos para as avaliações, foram examinados macro e mesoscopicamente à biomicroscopia com lâmpada de luz em fenda¹⁵, diariamente até o 30º dia de pós-operatório e a cada três dias até se completarem 120 dias. Parâmetros referentes a quemose, blefarospasmo, hiperemia conjuntival, hemorragia e secreção ocular foram estudados seguindo-se critério qualitativo, em que *nihil* representou ausência de sinais, (+) manifestação discreta dos mesmos, (++) sinais moderados e (+++) sinais intensos.

2.12 Avaliação das aderências

Para a avaliação das aderências, os animais foram novamente anestesiados seguindo-se o mesmo protocolo de indução anestésica adotado no item 2.5, para então, serem eutanasiados pela sua forma ativa. Portanto, estes animais foram, então, descartados nas avaliações subseqüentes. Os períodos de 15, 30, 60 e 120 dias de pós-operatório foram respeitados e admitiu-se critério de quantificação em que *nihil* representou a ausência de aderências, (+) poucas aderências, (++) aderências em

¹³ Maxitrol – Sulfato de Neomicina, Sulfato de Polimixina B e Dexametasona – Alcon do Brasil – São Paulo, SP, Brasil.

¹⁴ Temgesic 0,3 mg/ml – Cloridrato de Buprenorfina – Schering-Plough – Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

¹⁵ Portable Slit Lamp SL – 14 – Kowa – Tóquio, Japão.

quantidade moderada, (+++) muitas aderências. Quanto à sua intensidade, elas foram qualificadas segundo valores de zero a quatro, em que zero significou ausência do evento, 1 - adesão fina, facilmente separável por dissecação, 2 - adesão de discreta a moderada, 3 – aderência severa, de difícil dissecação, e 4 – aderência forte, não dissecável.

2.13 Microscopia de luz

Estudos foram conduzidos sob microscopia de luz. Para tanto, as áreas próprias às intervenções cirúrgicas, contendo a esclera e porções musculares, foram colhidas e esticadas sobre papelão, a fim de se manterem estendidas as suas fibras. Posteriormente, foram fixadas em solução de formol tamponado à 10%, por 24 horas, e processadas para inclusão em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram confeccionados. As lâminas foram coradas à hematoxilina-eosina e pelo tricrômico de Masson, e avaliadas quanto à sua celularidade e aos eventos relativos à fibrose, utilizando-se fotomicroscópio¹⁶ para a documentação científica. Estes estudos foram conduzidos no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – Ribeirão Preto.

2.14 Morfometria

Relativamente à cariometria (medidas do núcleo), cortes de 5 µm de espessura, corados à hematoxilina-eosina, foram estudados ao microscópio de luz¹⁷, com objetiva de imersão (1000x), munido de câmara de captura de imagem. As imagens foram projetadas em programa de computador¹⁸, para se calcularem o diâmetro maior e menor do núcleo das fibras musculares. Um total de 150 núcleos, por amostra, foi considerado para o cálculo do volume, da área e do perímetro nucleares, relação entre

¹⁶ Axioskop – Carl Zeiss – Oberkochen, Alemanha.

¹⁷ Jenaval – Carl Zeiss – Oberkochen, Alemanha.

¹⁸ KS - 100 versão 3.0 - Carl Zeiss – Oberkochen, Alemanha.

volume/área nuclear, excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno nuclear. Estes estudos foram conduzidos no Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP – Ribeirão Preto.

Para se avaliar a ação da MMC, no que se refere à fibroplasia, realizou-se contagem de fibroblastos nas áreas das mioplastias. Para tal, as lâminas coradas pela hematoxilina-eosina foram avaliadas, por meio de microscópio de luz, com aumento de 400x, adaptado a um sistema computadorizado de análise de imagens¹⁹. Foram fotografados cinco campos por lâmina, próximos às áreas das mioplastias e, posteriormente, identificação e contagem dos fibroblastos. Estes estudos foram conduzidos no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP – Jaboticabal.

2.15 Imunoistoquímica

Para realização da imunoistoquímica, cortes de 5µm de espessura foram confeccionados e fixados em lâminas silanizadas. Anticorpos policlonais do FGF-2²⁰ foram incluídos visando a se estudar a atividade fibroblástica. Admitiu-se o mesmo protocolo adotado por OH et al. (1999), que segue:

- 1- Desparafinização em xilol e hidratação em série decrescente de álcoois até se chegar a solução que contenha apenas água destilada;
- 2- Recuperação antigênica, em tampão citrato (pH 6), realizada em panela à vapor (*steamer*), por 30 minutos;
- 3- Esfriamento das lâminas, secagem das áreas ao redor dos cortes, formando-se “janelas”, e lavagem em PBS, por três vezes;
- 4- Aplicação, sobre os cortes, de peróxido de hidrogênio à 3%, por 20 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena;

¹⁹ Image PRO-PLUS - Cybernetics – California, USA.

²⁰ Fator de Crescimento Fibroblástico - FGF-2 (147): sc-79 lote: A3004 e FGF-2 (147)-G: sc-79-G lote: J1403 - Santa Cruz Biotechnology - USA.

- 5- Lavagem em PBS, por 3 vezes consecutivas;
- 6- Incubação em soro normal, por 30 minutos;
- 7- Aspiração, adição do anticorpo primário²⁰ sobre os cortes na diluição de 1/100 e manutenção por, aproximadamente, 17 horas (“*over night*”);
- 8- Lavagem em PBS, por três vezes consecutivas;
- 9- Incubação no anticorpo secundário por 30 minutos;
- 10- Lavagem em PBS, por três vezes consecutivas;
- 11- Incubação no complexo ABC (Streptavidina), em diluição de 1/100, por 30 minutos;
- 12- Lavagem em PBS, por três vezes consecutivas;
- 13- Aplicação, sobre os cortes, de DAB. Decorridos 30 segundos, inibição da reação com PBS;
- 14- Lavagem em água corrente;
- 15- As lâminas foram contra-coradas em Hematoxilina de Harris, por 40 segundos;
- 16- Submersão em água amoniacal, para obtenção da coloração azulada;
- 17- Lavagem em água corrente;
- 18- Desidratação em álcool;
- 19- Diafanização em xilol;
- 20- Montagem das lâminas;
- 21- Avaliação microscópica.

Preparo do Diaminobenzidine (DAB):

Solução A:

DAB - 5,0 mg
PBS - 8,0 mL

Solução B:

PBS - 750 µl
H₂O₂ (30vl Synth) 80 µl

Mixagem de 160 µl da solução B na solução A, no momento do uso.

Estes estudos foram conduzidos no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – Ribeirão Preto.

2.16 Análise à estatística

Os eventos clínicos foram analisados ao teste de Kruskal-Wallis (análise de variância de um fator para dados não paramétricos). Para análise dos resultados obtidos à cariometria, empregou-se programa de computador Prisma Graphics, versão 3.02, e, como teste estatístico, o de ANOVA, complementado pelo de Kruskal-Wallis. Para a quantificação fibroblástica, utilizou-se o teste de ANOVA, complementado pelo de Tukey, e, para todos os testes, respeitaram-se nível mínimo de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Estes estudos foram realizados no Departamento de Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP – Jaboticabal.

III. RESULTADOS

3.1 Avaliação clínica

Achados clínicos dos olhos operados revelaram quemose apenas nos primeiros dias do pós-operatório. Da comparação entre eles, não se encontraram diferenças relativamente aos seus controles (negativo e positivo) e aos tratados com MMC, nas concentrações de 0,008, 0,02 e 0,04% (Tabela 1 e Figuras 2 e 3).

Graus moderados de blefarospasmo, no primeiro dia da avaliação, foram observados apenas nos animais do grupo controle negativo. Nos demais, o evento deu-se de forma discreta ou foi ausente (Tabela 2 e Figuras 2 e 4).

Denotou-se intensa hiperemia conjuntival até o 5º dia da avaliação, na maioria dos animais e indistintamente entre os grupos, com tendência à diminuição nos períodos subseqüentes. Áreas de permeio ao fio da sutura conjuntival manifestaram intensa hiperemia que regrediu temporalmente (Tabela 3 e Figuras 2 e 5).

Hemorragia ocular não foi observada nos animais durante todo o período da avaliação. Quanto à secreção, quando presente, ela foi do tipo mucosa e com maior intensidade nos animais do grupo controle negativo, evoluindo para o grau moderado, com tendência à diminuição nos dias subseqüentes. Nos demais grupos, notaram-se graus discretos apenas nos dois primeiros dias de pós-operatório (Tabela 4 e Figuras 2 e 6).

Após recuo do músculo reto dorsal, observaram-se graus de hipotropia, que variaram de discretos a moderados. Graus de estrabismo estiveram diretamente relacionados com a intensidade do recuo, que variou de 5 a 8 mm (Figura 2). Esta variação ocorreu para se evitar a sobreposição da sutura mioescleral com o oblíquo dorsal, uma vez que o oblíquo possui largura diferente entre os animais.

Tabela 1. Quantidade de olhos de coelhos albinos adultos de laboratório acometidos por quemose, do 1° ao 120° dias da avaliação, nos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%. Jaboticabal, SP, 2006.

Sinal	Grau ¹	Controle Negativo								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Quemose	<i>nihil</i>			1	8	8	6	4	2	2
	+	3	5	7						
	++	4	3							
	+++	1								
Total (n)		8	8	8	8	8	6	4	2	2

Sinal	Grau ¹	Controle Positivo								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Quemose	<i>nihil</i>		8	11	20	22	18	12	6	6
	+	15	9	8	3	2				
	++	8	6	5	1					
	+++	1	1							
Total (n)		24	24	24	24	24	18	12	6	6

Sinal	Grau ¹	Mitomicina C 0,008%								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Quemose	<i>nihil</i>		3	5	18	20	18	12	6	6
	+	11	16	15	5	4				
	++	13	5	4	1					
	+++									
Total (n)		24	24	24	24	24	18	12	6	6

Sinal	Grau ¹	Mitomicina C 0,02%								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Quemose	<i>nihil</i>		3	8	15	19	18	12	6	6
	+	14	13	13	9	5				
	++	10	8	3						
	+++									
Total (n)		24	24	24	24	24	18	12	6	6

Sinal	Grau ¹	Mitomicina C 0,04%								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Quemose	<i>nihil</i>		3	7	11	15	18	12	6	6
	+	7	14	13	12	7				
	++	17	7	4	1	2				
	+++									
Total (n)		24	24	24	24	24	18	12	6	6

Notas: olhos que apresentaram quemose, ao considerarem-se a intensidade do sinal clínico, nos respectivos dias da avaliação.

1 - Sinal convencional utilizado: *nihil* representa ausência de sinais, + manifestação discreta, ++ sinais moderados, +++ sinais intensos.

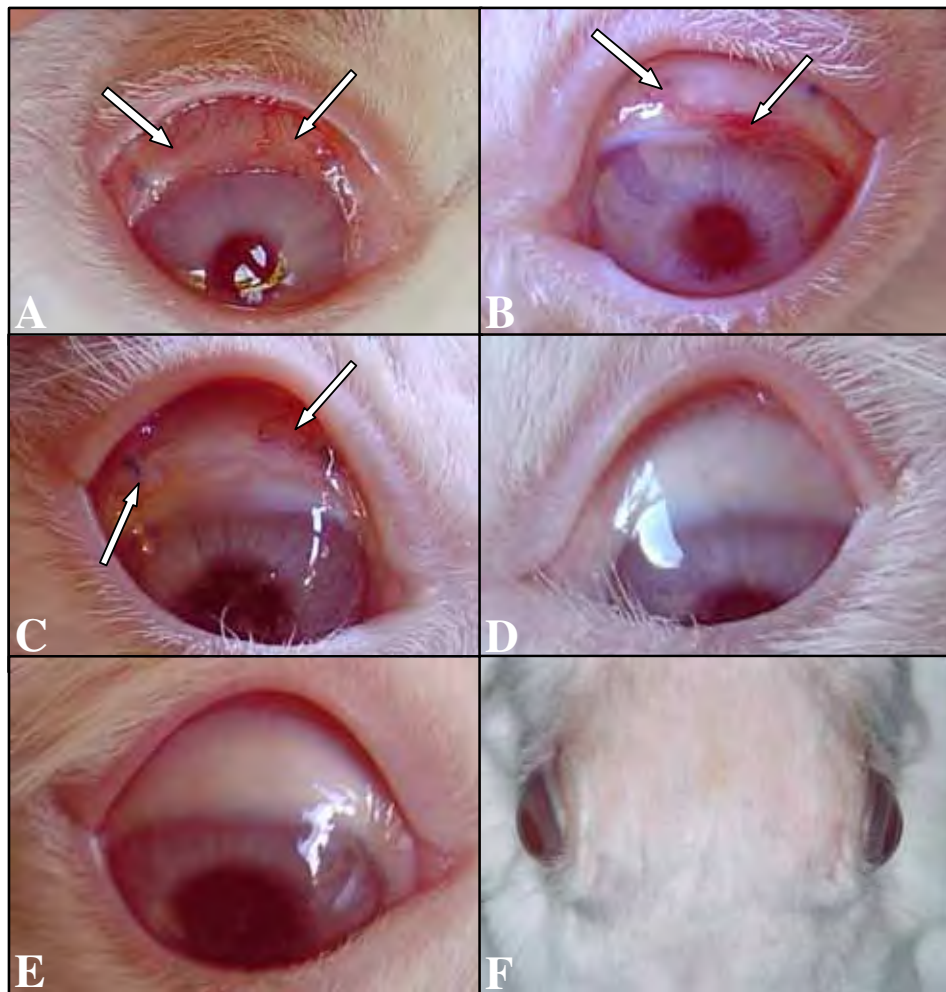


Figura 2. Imagens fotográficas ilustrando olhos de coelhos adultos albinos de laboratório, em diferentes dias de pós-operatório. Em A, observa-se, ao 1^o dia, intensa hiperemia conjuntival e moderada quemose. Em B, nota-se, aos cinco dias, moderada hiperemia conjuntival e discreta quemose. Em C, aos 10 dias, observa-se discreta hiperemia conjuntival. Em D e E, observa-se, aos 60 e 120 dias, ausência de alterações clínicas visíveis. Em F, denota-se a discreta hipotropia no olho direito. Jaboticabal, SP, 2006.

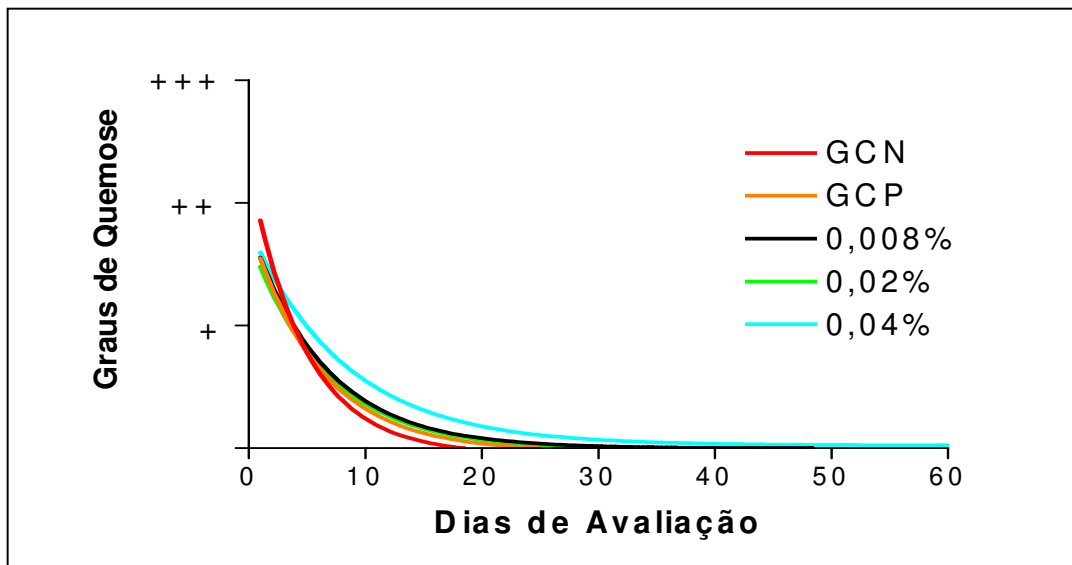


Figura 3. Representação gráfica dos graus de quemose dos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, do 1º ao 60º dias da avaliação, em olhos de coelhos adultos albinos de laboratório. Jaboticabal, SP, 2006.

Tabela 2. Quantidade de olhos de coelhos albinos adultos de laboratório acometidos por blefarospasmo, do 1° ao 120° dias da avaliação, nos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%. Jaboticabal, SP, 2006.

Sinal	Grau ¹	Controle Negativo								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Blefarospasmo	<i>nihil</i>	4	7	8	8	8	6	4	2	2
	+		1							
	++	4								
	+++									
Total (n)		8	8	8	8	8	6	4	2	2

Sinal	Grau ¹	Controle Positivo								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Blefarospasmo	<i>nihil</i>	24	24	24	24	24	18	12	6	6
	+									
	++									
	+++									
Total (n)		24	24	24	24	24	18	12	6	6

Sinal	Grau ¹	Mitomicina C 0,008%								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Blefarospasmo	<i>nihil</i>	24	24	24	24	24	18	12	6	6
	+									
	++									
	+++									
Total (n)		24	24	24	24	24	18	12	6	6

Sinal	Grau ¹	Mitomicina C 0,02%								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Blefarospasmo	<i>nihil</i>	23	24	24	24	24	18	12	6	6
	+	1								
	++									
	+++									
Total (n)		24	24	24	24	24	18	12	6	6

Sinal	Grau ¹	Mitomicina C 0,04%								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Blefarospasmo	<i>nihil</i>	24	24	24	24	24	18	12	6	6
	+									
	++									
	+++									
Total (n)		24	24	24	24	24	18	12	6	6

Notas: olhos que apresentaram blefarospasmo, ao considerarem-se a intensidade do sinal clínico, nos respectivos dias da avaliação.

1 - Sinal convencional utilizado: *nihil* representa ausência de sinais, + manifestação discreta, ++ sinais moderados, +++ sinais intensos.

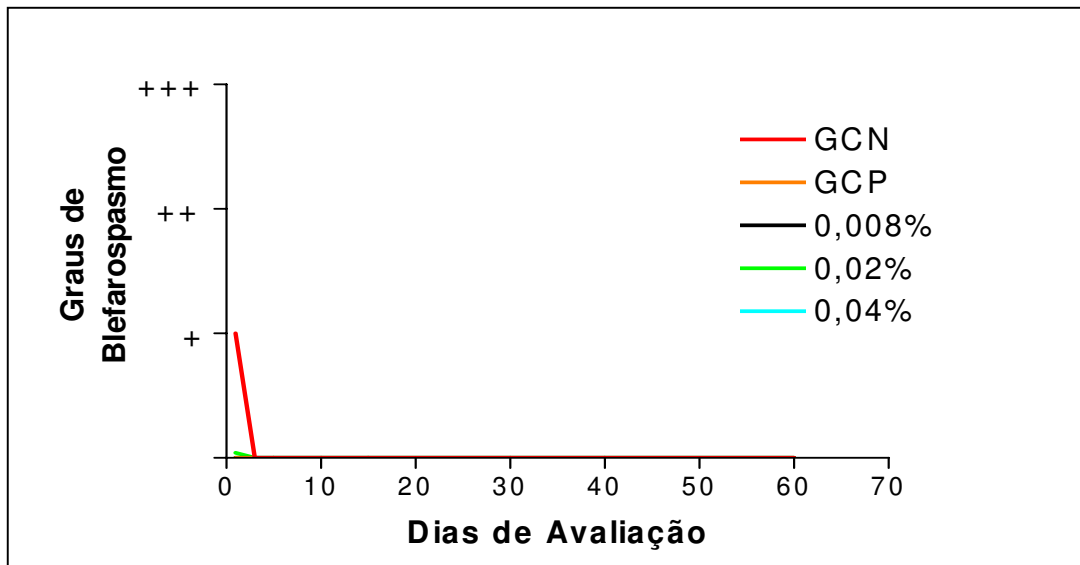


Figura 4. Representação gráfica dos graus de blefarospasmo dos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, do 1° ao 70° dias da avaliação, em olhos de coelhos adultos albinos de laboratório. Jaboticabal, SP, 2006.

Tabela 3. Quantidade de olhos de coelhos albinos adultos de laboratório acometidos por hiperemia conjuntival, do 1° ao 120° dias da avaliação, nos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%. Jaboticabal, SP, 2006.

Sinal	Grau ¹	Controle Negativo								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Hiperemia	<i>nihil</i>					1	6	4	2	2
	+				4	7				
	++			4	4					
	+++	8	8	4						
Total (n)		8	8	8	8	8	6	4	2	2
Sinal	Grau ¹	Controle Positivo								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Hiperemia	<i>nihil</i>					5	14	12	6	6
	+		1	4	7	15	4			
	++	4	8	13	16	4				
	+++	20	15	7	1					
Total (n)		24	24	24	24	24	18	12	6	6
Sinal	Grau ¹	Mitomicina C 0,008%								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Hiperemia	<i>nihil</i>					4	12	12	6	6
	+		1	2	13	11	6			
	++	6	7	17	9	8				
	+++	18	16	5	2	1				
Total (n)		24	24	24	24	24	18	12	6	6
Sinal	Grau ¹	Mitomicina C 0,02%								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Hiperemia	<i>nihil</i>					1	14	12	6	6
	+		2	6	11	20	4			
	++	6	8	14	13	3				
	+++	18	14	4						
Total (n)		24	24	24	24	24	18	12	6	6
Sinal	Grau ¹	Mitomicina C 0,04%								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Hiperemia	<i>nihil</i>					1	10	12	6	6
	+		1	5	11	18	8			
	++	8	13	16	11	4				
	+++	16	10	3	2	1				
Total (n)		24	24	24	24	24	18	12	6	6

Notas: olhos que apresentaram hiperemia conjuntival, ao considerarem-se a intensidade do sinal clínico, nos respectivos dias da avaliação.

1 - Sinal convencional utilizado: *nihil* representa ausência de sinais, + manifestação discreta, ++ sinais moderados, +++ sinais intensos.

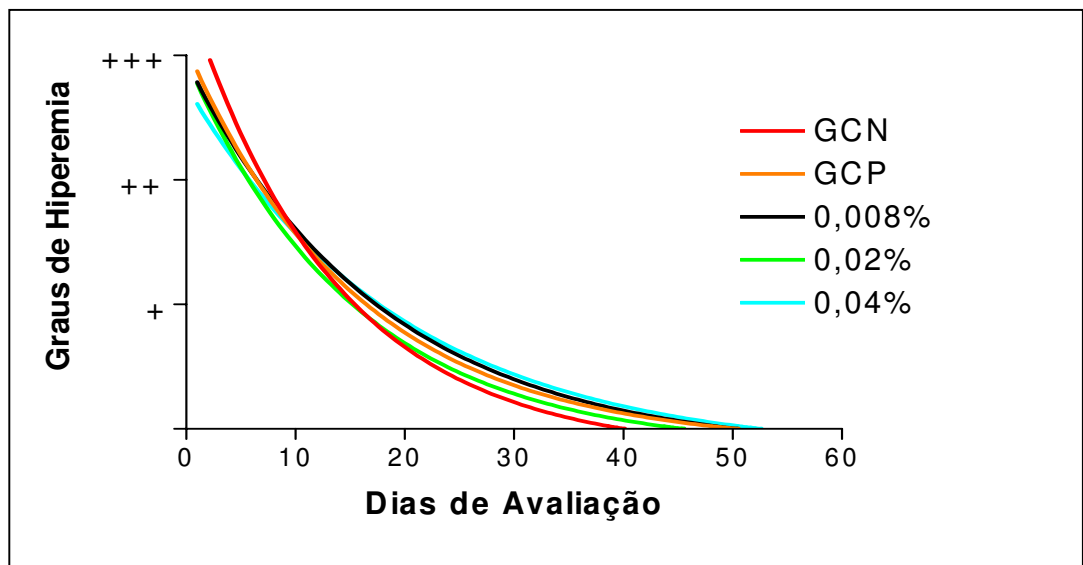


Figura 5. Representação gráfica dos graus de hiperemia conjuntival dos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, do 1° ao 60° dias da avaliação, em olhos de coelhos adultos albinos de laboratório. Jaboticabal, SP, 2006.

Tabela 4. Quantidade de olhos de coelhos albinos adultos de laboratório acometidos por secreção mucosa, do 1° ao 120° dias da avaliação, nos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%. Jaboticabal, SP, 2006.

Sinal	Grau ¹	Controle Negativo								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Secreção	<i>nihil</i>		2	4	8	8	6	4	2	2
	+	5	5	4						
	++	2	1							
	+++	1								
Total (n)		8	8	8	8	8	6	4	2	2

Sinal	Grau ¹	Controle Positivo								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Secreção	<i>nihil</i>	11	19	23	23	24	18	12	6	6
	+	12	5	1	1					
	++	1								
	+++									
Total (n)		24	24	24	24	24	18	12	6	6

Sinal	Grau ¹	Mitomicina C 0,008%								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Secreção	<i>nihil</i>	6	22	23	22	23	18	12	6	6
	+	16	2	1	2	1				
	++	2								
	+++									
Total (n)		24	24	24	24	24	18	12	6	6

Sinal	Grau ¹	Mitomicina C 0,02%								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Secreção	<i>nihil</i>	10	24	23	24	24	18	12	6	6
	+	14		1						
	++									
	+++									
Total (n)		24	24	24	24	24	18	12	6	6

Sinal	Grau ¹	Mitomicina C 0,04%								
		1	3	5	10	15	30	60	90	120
Secreção	<i>nihil</i>	13	20	23	23	23	18	12	6	6
	+	10	3	1	1	1				
	++	1	1							
	+++									
Total (n)		24	24	24	24	24	18	12	6	6

Notas: olhos que apresentaram secreção mucosa, ao considerarem-se a intensidade do sinal clínico, nos respectivos dias da avaliação.

1 - Sinal convencional utilizado: *nihil* representa ausência de sinais, + manifestação discreta, ++ sinais moderados, +++ sinais intensos.

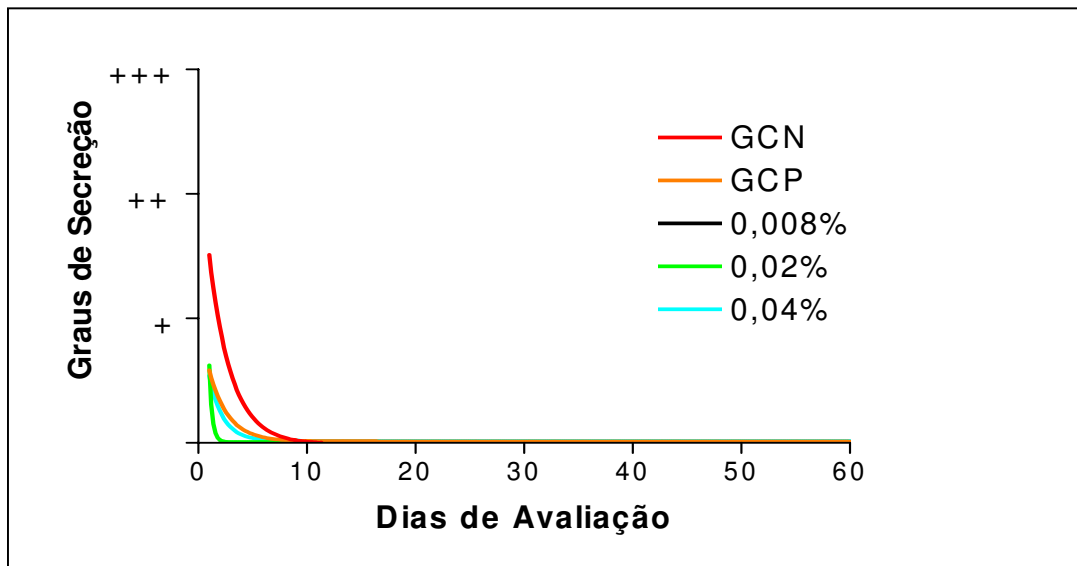


Figura 6. Representação gráfica dos graus de secreção dos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, do 1º ao 60º dias da avaliação, em olhos de coelhos adultos albinos de laboratório. Jaboticabal, SP, 2006.

3.2 Avaliação das aderências

Inicialmente, procedeu-se à avaliação topográfica das suturas conjuntivais e mioesclerais, para posteriormente fazê-lo quanto às aderências quando presentes. Observaram-se perdas das suturas conjuntivais entre o 15º e o 30º dias de pós-operatório. Na sutura mioescleral houve absorção do fio a partir do 30º dia de pós-operatório. Observou-se, ainda, ausência de deslocamento ou ruptura do músculo reto dorsal, em quaisquer dos tempos avaliados. Denotou-se perda da sutura mioescleral, em um olho do grupo 0,02%, aos 120 dias.

Relativamente às aderências, em todos os momentos da avaliação os olhos tratados com MMC apresentaram-nas em menor quantidade, comparativamente aos controles. No entanto, não se encontraram diferenças significativas, à estatística, entre os grupos avaliados ($p > 5\%$) (Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9 e Figura 7). Animais que não receberam a MMC (GCN e GCP) não apresentaram diferenças entre si. Entre os

animais tratados com a MMC (0,008, 0,02 e 0,04%) não se observaram diferenças ao longo da pesquisa.

Em relação ao grau de aderência, quando se compara olhos controle com os tratados com a MMC à 0,008%, observaram-se, clinicamente, menos aderências no grupo à 0,008%, em todos os períodos da avaliação, que, estatisticamente, não puderam ser confirmadas ($p>5\%$).

Ao se compararem os olhos controle com os tratados com MMC à 0,02%, observaram-se menos aderências nos animais tratados em todos os períodos, excetuando-se no 30° dia da avaliação, em que ela se mostrou semelhante entre o grupo controle positivo (GCP) e o que recebeu o fármaco à 0,02%. Diferenças estatísticas significativas não foram observadas em quaisquer dos momentos ($p>5\%$).

Olhos controle, quando comparados com olhos tratados com MMC à 0,04%, exibiram maior grau de aderência em todos os períodos de avaliação. Encontrou-se diferença estatística significativa apenas no 15° dia de pós-operatório ($p<0,01$), entre estes grupos. Os dados relativos aos resultados ora relatados encontram-se nas Tabelas 10, 11, 12, 13, 14, bem como na Figura 8.

Tabela 5. Quantidade de olhos de coelhos albinos adultos de laboratório que exibiram aderências aos 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo GCN. Jaboticabal, SP, 2006.

Aderência ¹	Controle Negativo			
	15	30	60	120
<i>nihil</i>				
+				
++	2	2	1	1
+++			1	1
Total	2	2	2	2

Notas: 1: (*nihil*) representa ausência de aderência, (+) poucas aderências, (++) aderências em quantidade moderada, (+++) muitas aderências.

Tabela 6. Quantidade de olhos de coelhos adultos albinos de laboratório que exibiram aderências aos 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo GCP. Jaboticabal, SP, 2006.

Aderência ¹	Controle Positivo			
	15	30	60	120
<i>nihil</i>				
+		3		1
++	4	3	3	2
+++	2		3	3
Total	6	6	6	6

Notas: 1: (*nihil*) representa ausência de aderência, (+) poucas aderências, (++) aderências em quantidade moderada, (+++) muitas aderências.

Tabela 7. Quantidade de olhos de coelhos adultos albinos de laboratório que exibiram aderências aos 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo 0,008%. Jaboticabal, SP, 2006.

Aderência ¹	Mitomicina 0,008%			
	15	30	60	120
<i>nihil</i>			1	
+	4	1	1	1
++	1	5	3	5
+++	1		1	
Total	6	6	6	6

Notas: 1: (*nihil*) representa ausência de aderência, (+) poucas aderências, (++) aderências em quantidade moderada, (+++) muitas aderências.

Tabela 8. Quantidade de olhos de coelhos adultos albinos de laboratório que exibiram aderências aos 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo 0,02%. Jaboticabal, SP, 2006.

Aderência ¹	Mitomicina 0,02%			
	15	30	60	120
<i>nihil</i>				
+	4	3	4	1
++	1	2	1	3
+++	1	1	1	1
Total	6	6	6	5

Notas: 1: (*nihil*) representa ausência de aderência, (+) poucas aderências, (++) aderências em quantidade moderada, (+++) muitas aderências.

Tabela 9. Quantidade de olhos de coelhos adultos albinos de laboratório que exibiram aderências aos 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo 0,04%. Jaboticabal, SP, 2006.

Aderência ¹	Mitomicina 0,04%			
	15	30	60	120
<i>nihil</i>				
+	3	1	2	
++	3	3	4	5
+++		2		1
Total	6	6	6	6

Notas: 1: (*nihil*) representa ausência de aderência, (+) poucas aderências, (++) aderências em quantidade moderada, (+++) muitas aderências.

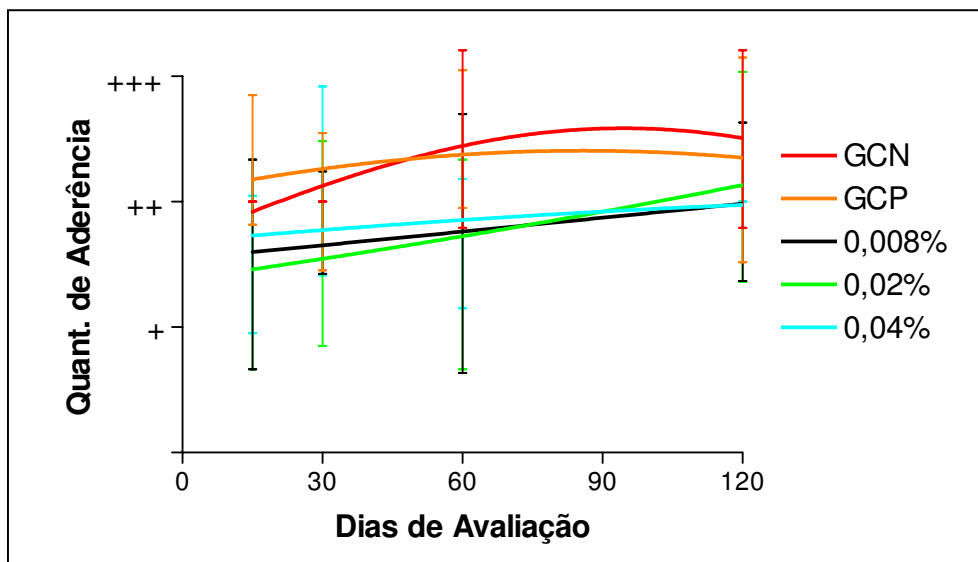


Figura 7. Representação gráfica da intensidade de aderência dos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, do 15° ao 120° dias de pós-operatório, em olhos de coelhos adultos albinos de laboratório. Jaboticabal, SP, 2006.

Tabela 10. Quantidade de olhos de coelhos adultos albinos de laboratório que exibiram aderências ao 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo GCN. Jaboticabal, SP, 2006.

Graus de Aderência ¹	Controle Negativo			
	15	30	60	120
0				
1				
2	1	1	1	
3	1	1	1	2
4				
Total	2	2	2	2

Notas: - Quantidade de olhos que apresentaram aderências, ao levar-se em consideração o seu grau e os períodos de avaliação.
 - 1: (0) representa ausência de aderência, (1) adesão fina, facilmente separável por dissecção, (2) adesão suave à moderada, (3) de moderada à severa, de difícil dissecção e (4) aderência forte, não dissecável.

Tabela 11. Quantidade de olhos de coelhos adultos albinos de laboratório que exibiram aderências ao 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo GCP. Jaboticabal, SP, 2006.

Graus de Aderência ¹	Controle Positivo			
	15	30	60	120
0				
1		1	1	1
2	2	4	4	1
3	4	1	1	3
4				1
Total	6	6	6	6

Notas: - Quantidade de olhos que apresentaram aderências, ao levar-se em consideração o seu grau e os períodos de avaliação.
 - 1: (0) representa ausência de aderência, (1) adesão fina, facilmente separável por dissecção, (2) adesão suave à moderada, (3) de moderada à severa, de difícil dissecção e (4) aderência forte, não dissecável.

Tabela 12. Quantidade de olhos de coelhos adultos albinos de laboratório que exibiram aderências ao 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo 0,008%. Jaboticabal, SP, 2006.

Graus de Aderência ¹	Mitomicina 0,008%			
	15	30	60	120
0			1	
1	3	2	1	1
2	3	4	4	4
3				1
4				
Total	6	6	6	6

Notas: - Quantidade de olhos que apresentaram aderências, ao levar-se em consideração o seu grau e os períodos de avaliação.
 - 1: (0) representa ausência de aderência, (1) adesão fina, facilmente separável por dissecção, (2) adesão suave à moderada, (3) de moderada à severa, de difícil dissecção e (4) aderência forte, não dissecável.

Tabela 13. Quantidade de olhos de coelhos adultos albinos de laboratório que exibiram aderências ao 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo 0,02%. Jaboticabal, SP, 2006.

Graus de Aderência ¹	Mitomicina 0,02%			
	15	30	60	120 ²
0				
1	3	2	4	1
2	2	2	2	2
3	1	2		2
4				
Total	6	6	6	5

Notas: - Quantidade de olhos que apresentaram aderências, ao levar-se em consideração o seu grau e os períodos de avaliação.
 - 1: (0) representa ausência de aderência, (1) adesão fina, facilmente separável por dissecção, (2) adesão suave à moderada, (3) de moderada à severa, de difícil dissecção e (4) aderência forte, não dissecável.
 - 2: não foi observado sutura mioescleral em um animal.

Tabela 14. Quantidade de olhos de coelhos adultos albinos de laboratório que exibiram aderências ao 15°, 30°, 60° e 120° dias da avaliação, no grupo 0,04%. Jaboticabal, SP, 2006.

Graus de Aderência ¹	Mitomicina 0,04%			
	15	30	60	120
0				
1	6	2	2	2
2		3	4	2
3		1		2
4				
Total	6	6	6	6

Notas: - Quantidade de olhos que apresentaram aderências, ao levar-se em consideração o seu grau e os períodos de avaliação.
 - 1: (0) representa ausência de aderência, (1) adesão fina, facilmente separável por dissecção (2) adesão suave à moderada, (3) de moderada à severa, de difícil dissecção, e (4) aderência forte, não dissecável.

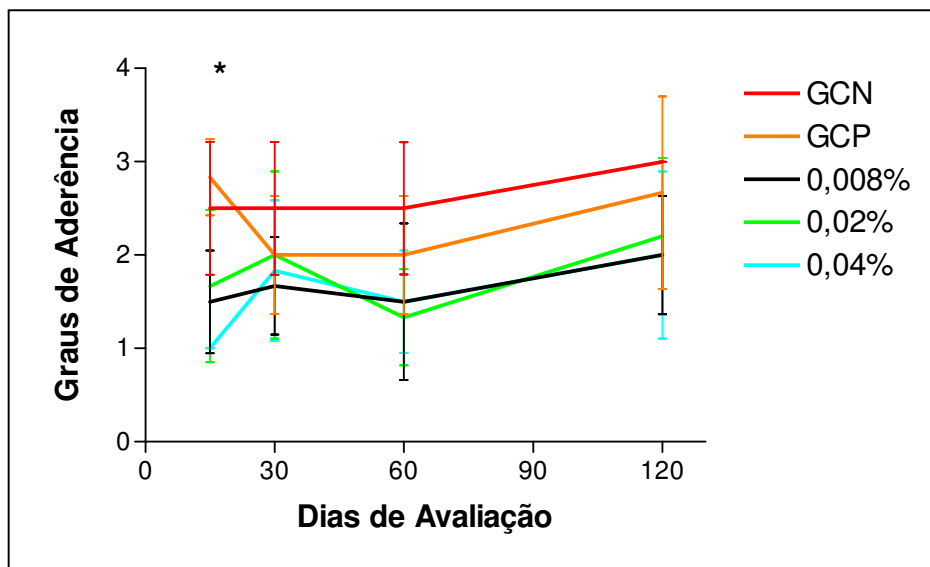


Figura 8. Representação gráfica dos graus de aderência dos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, do 15° ao 120° dias da avaliação, em olhos de coelhos adultos albinos de laboratório. (*) - diferença estatística entre os grupos controle e os tratados ($p < 5\%$). Jaboticabal, SP, 2006.

3.3 Microscopia de luz

Aos 15 dias de pós-operatório:

GCN:

Neste grupo, denotou-se intensa inflamação granulomatosa reacional ao fio de sutura, com infiltrado linfocitário variando de discreto à moderado e fibroplasia bem evidenciada. Houve discreta fibrose permeando as fibras musculares (Figuras 9 e 10).

GCP:

Observou-se intensa inflamação granulomatosa reacional ao fio de sutura, com discreto infiltrado linfocitário e fibroplasia. Houve discreta fibrose (Figuras 9 e 10).

Grupo MMC 0,008%:

Notou-se intensa inflamação granulomatosa reacional ao fio de sutura, com infiltrado linfocitário variando de discreto à moderado. Observaram-se graus moderados de fibrose na maioria dos animais. Em apenas um, ele foi intenso (Figuras 9 e 10).

Grupo MMC 0,02%:

Observou-se intensa inflamação granulomatosa reacional ao fio de sutura e moderado infiltrado linfocitário. Adjunto, discreta fibrose em um animal, discreta à moderada em um outro e moderada nos demais (Figuras 9 e 10).

Grupo MMC 0,04%:

Notou-se reação inflamatória granulomatosa intensa, reacional ao fio de sutura, e infiltrado linfocitário moderado. Houve discreta fibrose em um dos animais, enquanto nos demais ela foi intensa (Figuras 9 e 10).

Aos 30 dias de pós-operatório:**GCN:**

Denotou-se intensa reação inflamatória granulomatosa ao fio de sutura, à similitude dos 15 dias, com infiltrado linfocitário discreto e fibroplastia. Fibrose, de permeio às fibras musculares, em graus moderados, foi igualmente observada (Figuras 9 e 10).

GCP:

Decorreu intensa reação inflamatória granulomatosa, à semelhança do encontrado aos 15 dias, com intensa proliferação linfocitária e fibroplastia. Graus moderados de fibrose foram observados (Figuras 9 e 10).

Grupo MMC 0,008%:

Identificou-se intensa reação inflamatória granulomatosa ao fio de sutura, bem como discreta reação linfocitária, à semelhança do observado aos 15 dias. Quanto à fibrose, em três animais ela foi discreta e em outros três, moderada (Figuras 9 e 10).

Grupo MMC 0,02%:

Observou-se reação granulomatosa ao fio de sutura em grau intenso, à similitude do ocorrido aos 15 dias, com discreta infiltração linfocitária. Denotaram-se, em três dos animais, graus discretos de fibrose e, nos demais, graus moderados (Figuras 9 e 10).

Grupo MMC 0,04%:

Decorreu reação granulomatosa intensa, como no período de 15 dias e discreta reação linfocitária. Observaram-se graus moderados de fibrose na maioria dos animais, à exceção de um caso em que ela esteve discreta (Figuras 9 e 10).

Aos 60 dias de pós-operatório:**GCN:**

Houve diminuição da reação inflamatória ao fio de sutura e permaneceu a fibrose, em grau moderado, na maioria dos animais. Em alguns, identificaram-se células gigantes e resquícios do fio de sutura (Figuras 9 e 10).

GCP:

Denotou-se involução da reação granulomatosa, poucas células linfocitárias e, na maioria dos animais, ausência do fio de sutura. Fibrose moderada pôde, ainda, ser identificada (Figuras 9 e 10).

Grupo MMC 0,008%:

A reação granulomatosa persistiu, em grau moderado, inclusive com resquícios de fio de sutura e com discreto infiltrado linfocitário. A fibrose foi observada em graus moderados.

Grupo MMC 0,02%:

Houve persistência do quadro inflamatório granulomatoso sem a presença do fio de sutura. Observou-se discreta fibrose em um dos animais. Nos demais, ela foi moderada (Figuras 9 e 10).

Grupo MMC 0,04%:

Não se encontrou reação granulomatosa, apenas fibrose, que variou de discreta, em três animais, à moderada nos demais (Figuras 9 e 10).

Aos 120 dias de pós-operatório:**GCN:**

Não se distinguiu reação granulomatosa ao fio de sutura, permanecendo discreta fibrose (Figuras 9 e 10).

GCP:

Não se observou reação granulomatosa, permanecendo, apenas, fibrose moderada (Figuras 9 e 10).

Grupo MMC 0,008%:

Não se evidenciou reação granulomatosa, permanecendo, apenas, fibrose em graus que variaram de discreto a moderado (Figuras 9 e 10).

Grupo MMC 0,02%:

Houve persistência da reação inflamatória granulomatosa, em três dos animais do grupo, inclusive com resquícios de fios de sutura em fase de absorção. Graus de fibrose variaram de discreto a moderado entre os animais (Figuras 9 e 10).

Grupo MMC 0,04%:

Não se evidenciou reação granulomatosa, permanecendo, apenas, fibrose moderada (Figuras 9 e 10).

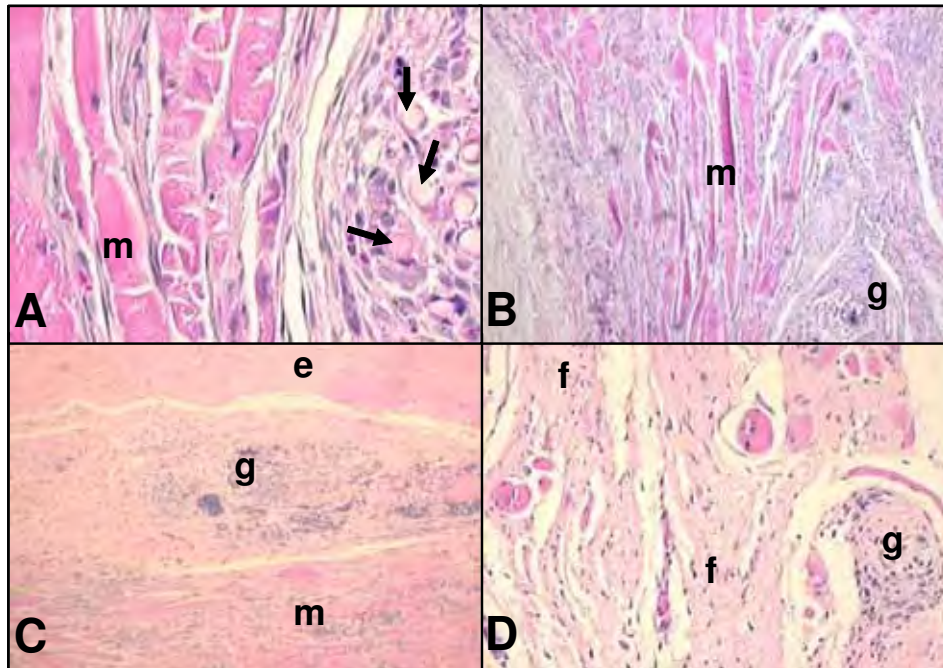


Figura 9. Fotomicrografias de áreas adjacentes às mioplastias do reto dorsal de coelhos adultos albinos de laboratório, nos diferentes grupos e períodos. A- 15 dias (GCP): observa-se intenso processo inflamatório granulomatoso entre o músculo (m), com presença do fio de sutura (setas) (HE, 300x). B- 30 dias (GCP): persiste o intenso processo inflamatório granulomatoso e o granuloma (g), com intensa proliferação linfocitária (HE, 60x). C- 60 dias (0,02%): nota-se diminuição da reação granulomatosa e do granuloma (g) entre a esclera (e) e o músculo (m) (HE, 60x). D- 120 dias (0,02%): observa-se a persistência do granuloma (g) e fibrose (f) (HE, 150x). Jaboticabal, SP, 2006.

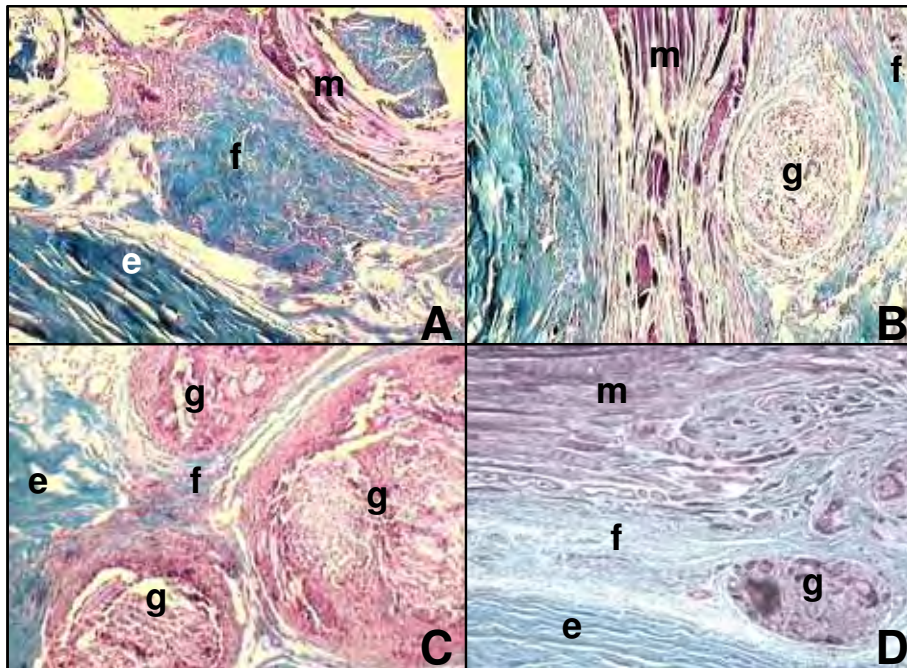


Figura 10. Fotomicrografias de áreas adjacentes às mioplastias do reto dorsal de coelhos adultos albinos de laboratório, nos diferentes grupos e períodos. A- 15 dias (0,008%): observa-se intensa fibrose (f) entre o músculo (m) e a esclera (e), (Tric, 60x). B- 30 dias (GCP): denota-se fibrose (f) moderada ao redor do granuloma (g) e entre as fibras musculares (m) (Tric, 60x). C- 60 dias (0,04%): nota-se, discreta fibrose (f) entre a esclera (e) e os granulomas (g) (Tric, 60x). D- 120 (0,02%): denota-se fibrose (f) moderada entre o músculo (m), o granuloma (g) e a esclera (e) (Tric, 100x). Jaboticabal, SP, 2006.

3.4 Morfometria

Da análise dos núcleos das fibras musculares, nos períodos de 15, 30, 60 e 120 dias de pós-operatório, constatou-se:

Volume nuclear:

No GCN, observaram-se valores próximos de $165 \mu\text{m}^3$ ao longo da avaliação, com exceção do período de 60 dias, onde houve aumento nos seus valores (Tabelas 15, 16, 17, e 18 e Figura 11).

Nos grupos GCP e 0,008%, poucas alterações temporais foram observadas. Para os grupos 0,02 e 0,04% denotaram-se diminuição do volume nuclear a partir dos 60 dias.

No computo geral, os grupos controle apresentaram pouca variação no volume nuclear ao longo da avaliação. Já nos tratados com a MMC, denotou-se sua diminuição ao longo do tempo, principalmente, no grupo 0,02%.

Relativamente à estatística, não se identificaram diferenças significativas entre os grupos ($p > 5\%$).

Tabela 15. Médias dos valores, à morfometria, dos núcleos das fibras musculares do músculo reto dorsal de olhos de coelhos adultos albinos de laboratório, aos 15 dias da avaliação. Jaboticabal, SP, 2006.

Parâmetros \ Grupos	Grupos				
	GCN	GCP	0,008%	0,02%	0,04%
Volume Nuclear (μm^3)	162,86	186,92	219,25	187,10	203,10
Área Nuclear (μm^2)	48,50	52,67	68,17	53,08	56,83
Perímetro (μm)	33,73	35,29	40,43	35,48	36,88
Relação Vol. / Área	3,22	3,32	3,78	3,30	3,44
Excentricidade	0,92	0,92	0,91	0,92	0,92
Coef. de Forma	0,53	0,53	0,53	0,52	0,53
Índice de Contorno	4,90	4,95	4,95	4,95	4,94

Notas: Vol. – Volume;
Coef. – Coeficiente

Tabela 16. Médias dos valores, à morfometria, dos núcleos das fibras musculares do músculo reto dorsal de olhos de coelhos adultos albinos de laboratório, aos 30 dias da avaliação. Jaboticabal, SP, 2006.

Parâmetros \ Grupos	Grupos				
	GCN	GCP	0,008%	0,02%	0,04%
Volume Nuclear (μm^3)	168,60	192,13	208,67	184,34	246,86
Área Nuclear (μm^2)	52,71	54,47	57,27	52,73	62,95
Perímetro (μm)	37,78	36,19	36,77	35,22	37,7
Relação Vol. / Área	3,08	3,35	3,52	3,35	3,76
Excentricidade	0,94	0,92	0,91	0,91	0,90
Coef. de Forma	0,47	0,52	0,53	0,53	0,55
Índice de Contorno	5,25	4,97	4,90	4,91	4,80

Notas: Vol. – Volume;
Coef. – Coeficiente

Tabela 17. Médias dos valores, à morfometria, dos núcleos das fibras musculares do músculo reto dorsal de olhos de coelhos adultos albinos de laboratório, aos 60 dias da avaliação. Jaboticabal, SP, 2006.

Parâmetros \ Grupos	Grupos				
	GCN	GCP	0,008%	0,02%	0,04%
Volume Nuclear (μm^3)	258,25	174,29	207,79	117,86	137,59
Área Nuclear (μm^2)	65,92	48,77	56,04	40,20	43,60
Perímetro (μm)	39,59	32,59	36,17	31,86	32,81
Relação Vol. / Área	3,73	3,38	3,48	2,82	2,94
Excentricidade	0,91	0,89	0,91	0,92	0,92
Coef. de Forma	0,54	0,57	0,54	0,51	0,51
Índice de Contorno	4,91	4,73	4,90	5,08	5,07

Notas: Vol. – Volume;
Coef. – Coeficiente

Tabela 18. Médias dos valores, à morfometria, dos núcleos das fibras musculares do músculo reto dorsal de olhos de coelhos adultos albinos de laboratório, aos 120 dias da avaliação. Jaboticabal, SP, 2006.

Parâmetros \ Grupos	Grupos				
	GCN	GCP	0,008%	0,02%	0,04%
Volume Nuclear (μm^3)	165,71	168,37	170,34	120,83	181,74
Área Nuclear (μm^2)	48,11	47,83	50,06	41,19	52,27
Perímetro (μm)	33,17	32,21	35,08	32,66	35,80
Relação Vol. / Área	3,24	3,35	3,15	2,80	3,20
Excentricidade	0,91	0,89	0,92	0,93	0,93
Coef. de Forma	0,54	0,58	0,50	0,49	0,50
Índice de Contorno	4,87	4,72	5,06	5,15	5,06

Notas: Vol. – Volume;
Coef. – Coeficiente

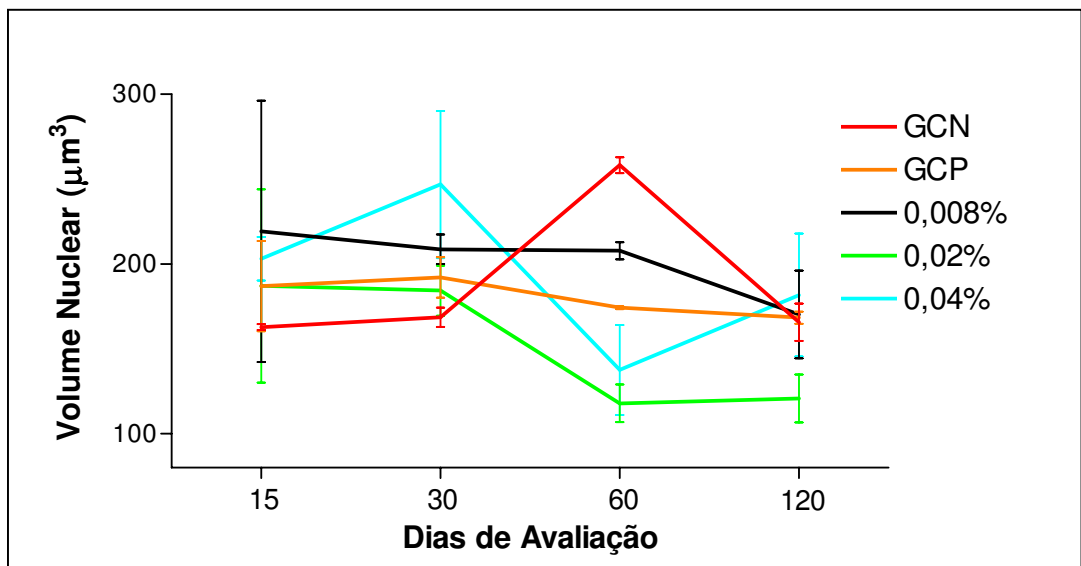


Figura 11. Representação gráfica do volume nuclear dos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, do 15° ao 120° dias da avaliação, em olhos de coelhos adultos albinos de laboratório. Jaboticabal, SP, 2006.

Área nuclear:

Olhos controles (GCN e GCP) tenderam à apresentar as mesmas áreas nucleares em todos os tempos da avaliação, à exceção do período de 60 dias em que o GCN exibiu valores maiores que o GCP (Tabelas 15, 16, 17, e 18 e Figura 12).

Para os olhos tratados com a MMC, notaram-se valores semelhantes entre os grupos, com discreta tendência de diminuição temporal da área nuclear, principalmente, no grupo 0,02%. Em nenhum momento verificou-se diferença significativa, à estatística, entre os grupos ($p > 5\%$).

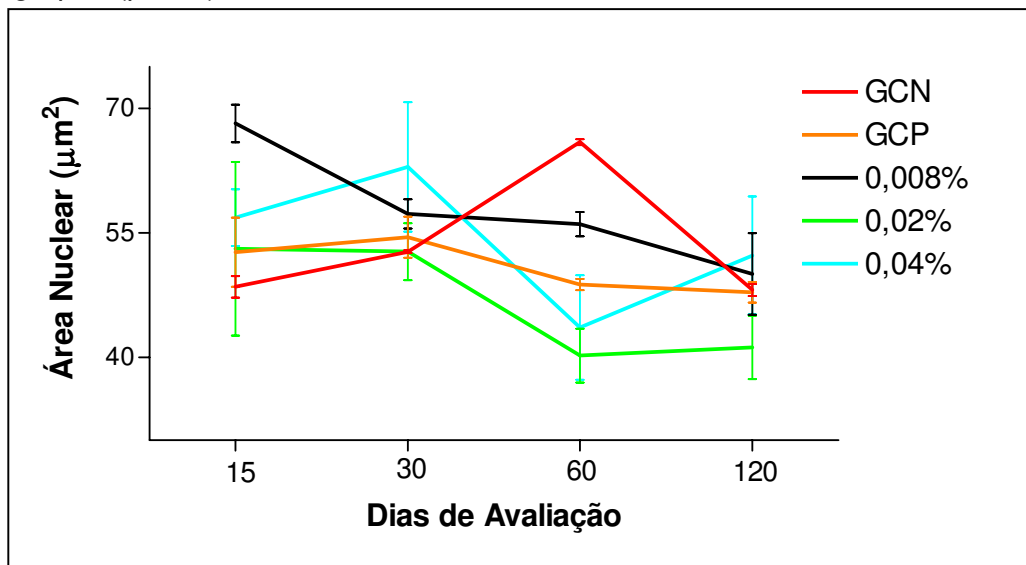


Figura 12. Representação gráfica da área nuclear dos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, do 15° ao 120° dias da avaliação, em olhos de coelhos adultos albinos de laboratório. Jaboticabal, SP, 2006.

Perímetro nuclear:

Em todos os grupos, denotaram-se valores semelhantes com poucas variações ao longo do tempo. No geral, houve tendência à sua diminuição ao longo do tempo. Igualmente, não se denotaram diferenças significativa, à estatística, entre os grupos ($p > 5\%$) (Tabelas 15, 16, 17, e 18 e Figura 13).

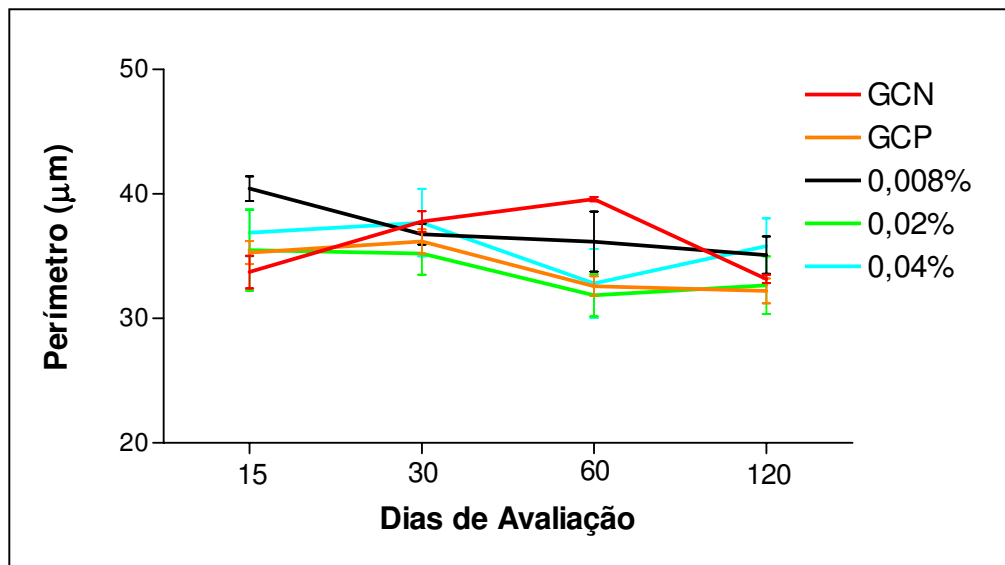


Figura 13. Representação gráfica do perímetro nuclear dos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, do 15º ao 120º dias da avaliação, em olhos de coelhos adultos albinos de laboratório. Jaboticabal, SP, 2006.

Relação volume / área nuclear:

Poucas variações foram observadas em todos os grupos e períodos avaliados. Diferenças, à estatística, não foram observadas ($p > 5\%$) (Tabelas 15, 16, 17, e 18 e Figura 14).

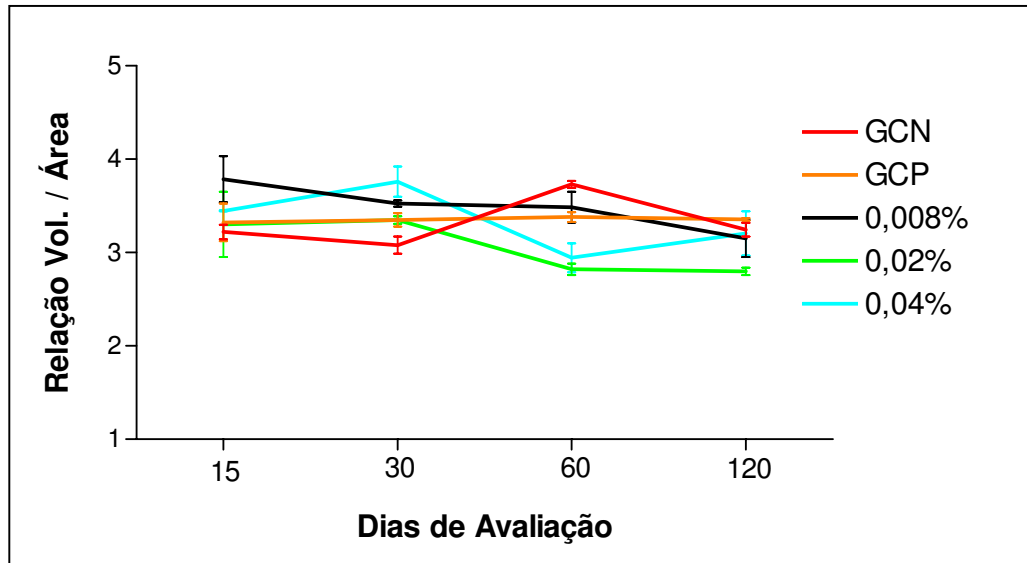


Figura 14. Representação gráfica da relação volume / área nuclear dos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, do 15° ao 120° dias da avaliação, em olhos de coelhos adultos albinos de laboratório. Jaboticabal, SP, 2006.

Excentricidade nuclear:

Observou-se pouca variação nos grupos controle e tratados com a MMC. Não foram encontradas diferenças, à estatística, entre os grupos, durante todo o período de avaliação ($p > 5\%$) (Tabelas 15, 16, 17, e 18 e Figura 15).

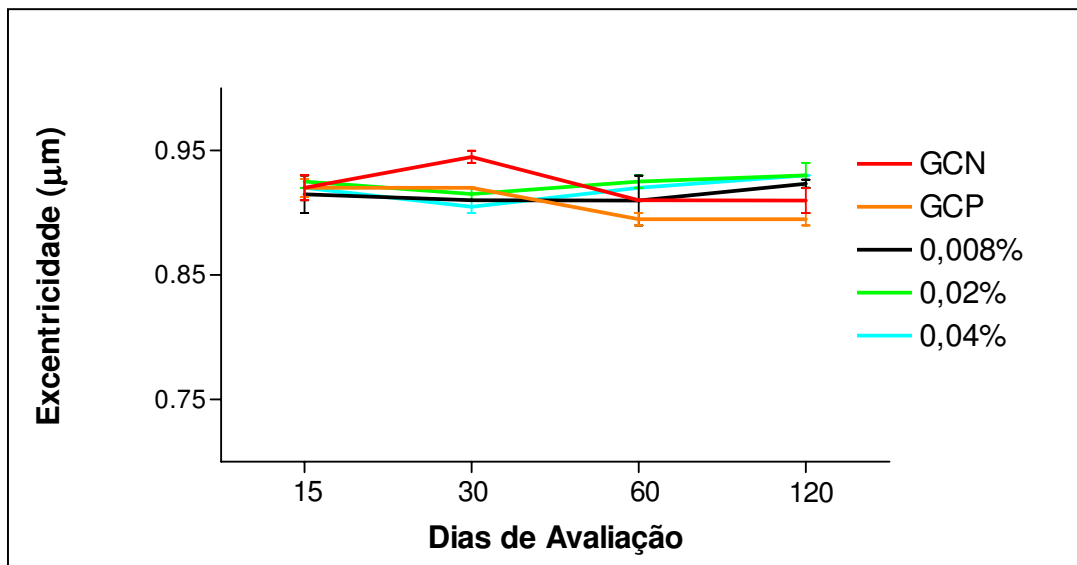


Figura 15. Representação gráfica da excentricidade nuclear dos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, do 15º ao 120º dias da avaliação, em olhos de coelhos adultos albinos de laboratório. Jaboticabal, SP, 2006.

Coeficiente de forma nuclear:

Denotaram-se poucas alterações do coeficiente de forma em todos os grupos, ao longo da avaliação. Diferenças à estatística não foram observadas ($p > 5\%$) (Tabelas 15, 16, 17, e 18 e Figura 16).

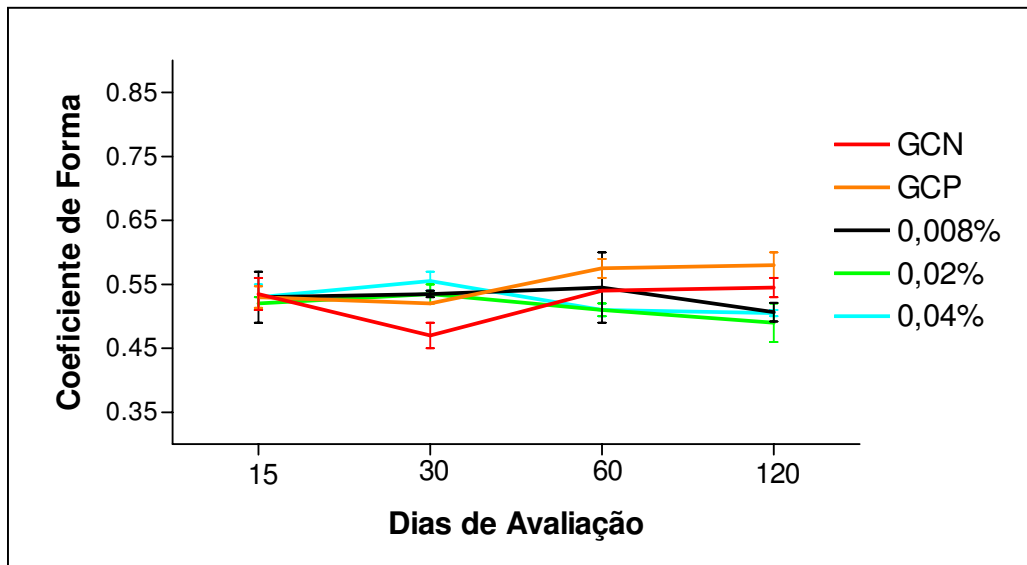


Figura 16. Representação gráfica do coeficiente de forma nuclear dos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, do 15º ao 120º dias da avaliação, em olhos de coelhos adultos albinos de laboratório. Jaboticabal, SP, 2006.

Índice de contorno nuclear:

Valores dos índices de contorno nucleares apresentaram discretas alterações em todos os grupos e tempos avaliados. Portanto, diferenças, à estatística, não foram observadas ($p > 5\%$) (Tabelas 15, 16, 17, e 18 e Figura 17).

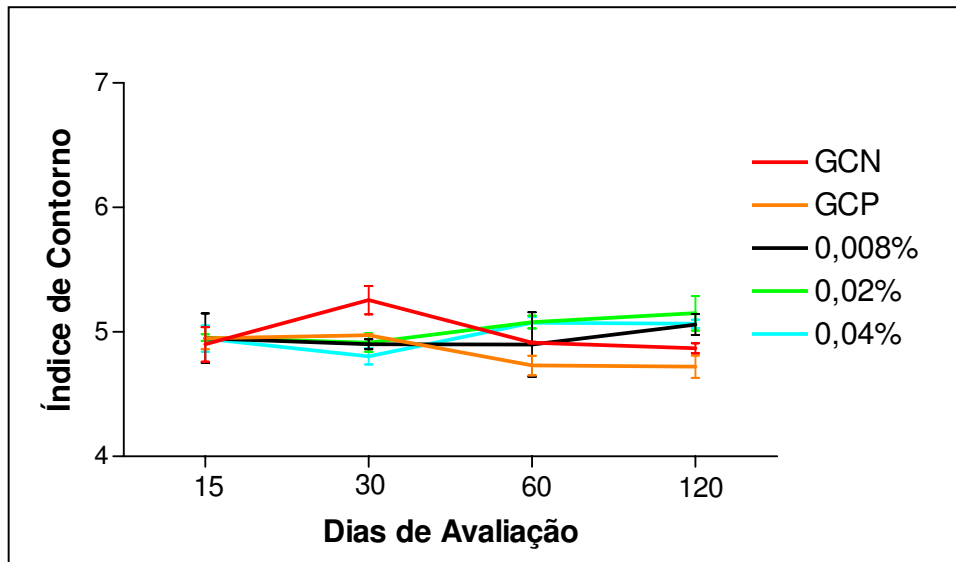


Figura 17. Representação gráfica do índice de contorno nuclear dos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, pela mediana, do 15° ao 120° dias da avaliação, em olhos de coelhos adultos albinos de laboratório. Jaboticabal, SP, 2006.

Quantificação fibroblástica:

Relativamente à quantificação fibroblástica, observou-se no GCN aumento do quantitativo de fibroblastos até os 60 dias e, depois, diminuição. No GCP, denotou-se aumento no quantitativo, ao longo de toda avaliação. No grupo 0,008%, denotaram-se diminuição dos fibroblastos no 30º dia da avaliação e, a partir daí, aumento dos seus valores, tendendo a restabelecer os valores do 15º dia. Para o grupo 0,02%, o quantitativo de fibroblastos aumentou e diminuiu ao longo da avaliação, oscilando entre 58 a 78. O grupo 0,04% apresentou pouca quantidade de fibroblastos, no 15º dia, com aumento dos seus valores ao longo da avaliação (Tabela 19 e Figura 18).

Diferenças, à estatística, não foram significativas ($p > 5\%$), à exceção da comparação entre o GCN e 0,008%, aos 60 dias, onde foi encontrada diferença ($p < 5\%$).

Tabela 19. Médias e desvios padrão (D.P.) dos valores de fibroblastos, das áreas adjacentes às mioplastias do reto dorsal de coelhos adultos albinos de laboratório, do 15º ao 120º dias da avaliação. Jaboticabal, SP, 2006.

Dias	GCN		GCP		0,008%		0,02%		0,04%	
	Média	D. P.	Média	D. P.	Média	D. P.	Média	D. P.	Média	D. P.
15	54,3	22,7	59,7	26	73	62	71,3	25,9	34,5	8,7
30	66,9	19,6	72,4	39,4	42,4	12,45	58,7	22,9	57,3	14,1
60	96,4	37,9	75,4	7,7	51,5	22	77,8	14,8	66,9	28
120	73	9,8	84,1	16,4	72,4	31,5	70,1	18,3	72,9	17,2

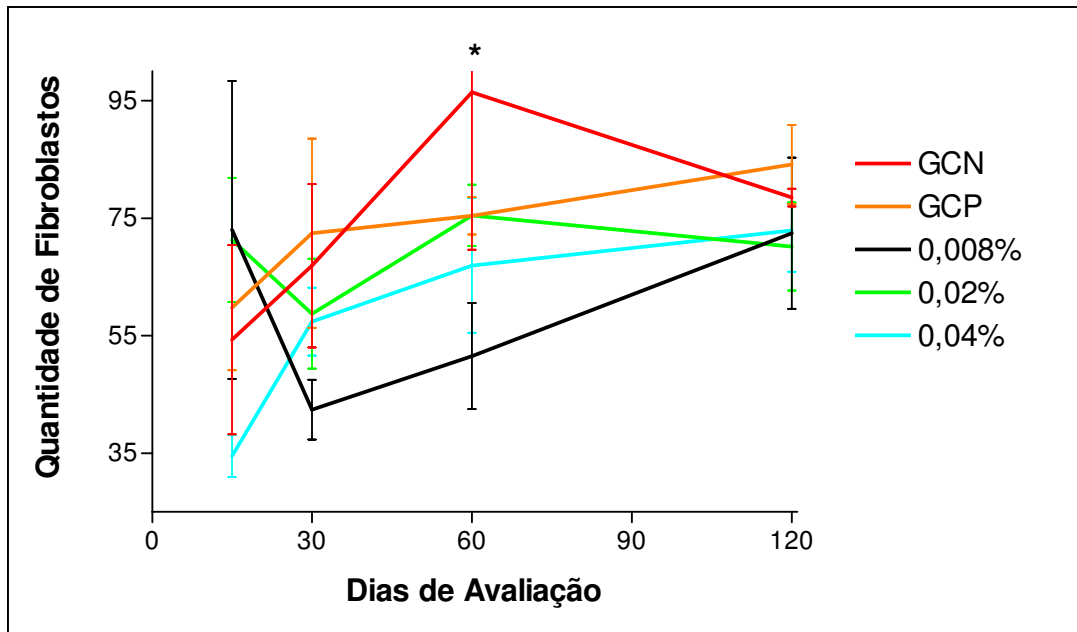


Figura 18. Representação gráfica da quantidade de fibroblastos dos grupos GCN, GCP, 0,008%, 0,02% e 0,04%, do 15° ao 120° dias da avaliação, em olhos de coelhos adultos albinos de laboratório. (*) - diferença estatística, entre os grupos GCN e 0,008% ($p < 5\%$). Jaboticabal, SP, 2006.

3.5 Imunoistoquímica

Expressão do fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) foi identificada em fibroblastos e macrófagos, em graus variados, segundo os períodos da avaliação. Aos 15 dias, observaram-se graus que variaram de moderados a intensos, nos animais do GCN e, nos demais, que variaram de leve a moderado. Aos 30 dias, houve tendência ao aumento da expressão deste fator de crescimento em todos os grupos. No GCN, a expressão passou para grau intenso, enquanto nos demais, se manteve em grau moderado. Decorridos 30 dias, observou-se forte diminuição da marcação variável em todos os grupos, que atingiram graus discretos aos 120 dias (Figura 19).

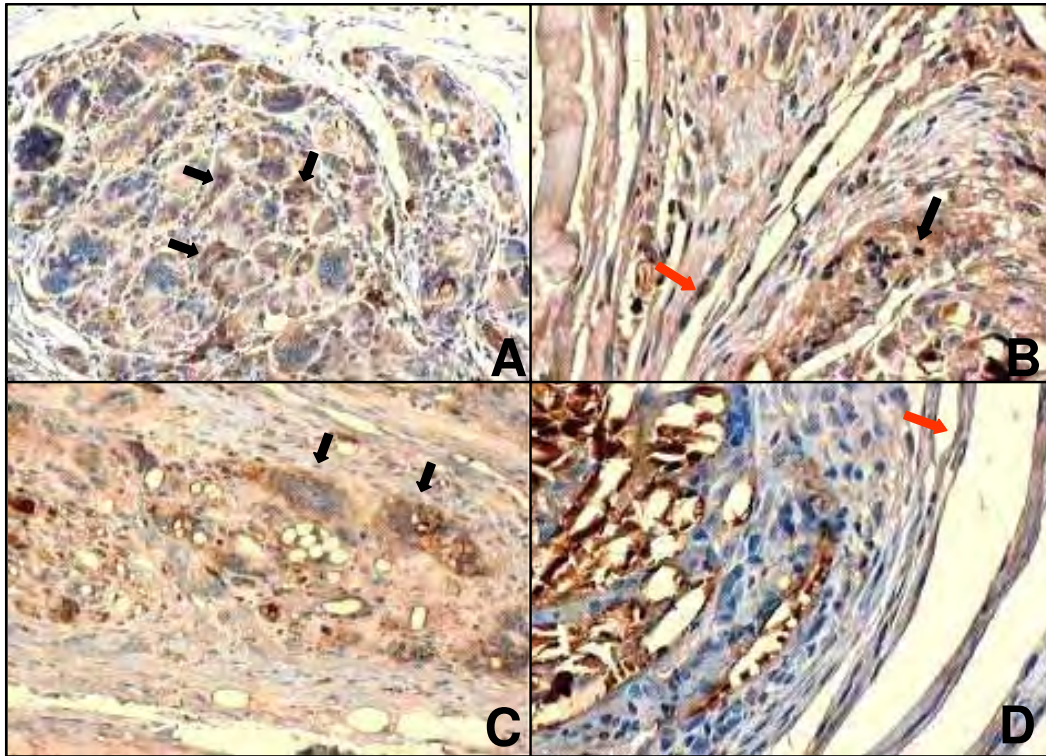


Figura 19. Fotomicrografias de áreas adjacentes às mioplastias do reto dorsal de coelhos adultos albinos de laboratório, nos diferentes grupos e períodos. A- 15 dias (GCN): observa-se expressão moderada do FGF-2 em macrófagos (setas escuras), (Imuno, 150x). B- 30 dias (0,008%): denota-se moderada marcação do FGF-2 em macrófago (seta escura) e fibroblastos (seta vermelha) (Imuno, 300x). C- 60 dias (0,02%): nota-se a expressão do FGF-2 com variação de discreta à moderada, notadamente, em macrófagos (setas escuras) (Imuno, 150x). D- 120 dias (0,04%): destaca-se marcação discreta em fibroblastos (seta vermelha) (Imuno, 300x). Jaboticabal, SP, 2006.

IV. DISCUSSÃO

Optou-se por se estudar a mitomicina C, face às suas reconhecidas propriedades, notadamente quanto à ação antifibrótica, bem como pela controvérsia de resultados da literatura, quanto à sua real eficácia no controle de aderências e pelos poucos estudos quanto aos seus efeitos colaterais.

As concentrações de 0,02 e 0,04% foram adotadas, valendo-se da experiência de outros autores que assim a empregaram, mas que divergiram quanto aos resultados obtidos, relativamente à sua eficácia (CRUZ & MATKOVICH, 1995; BROOKS, et al., 1996; CRUZ, 1996; MINGUINI et al., 2000; MAHINDRAKAR et al., 2001). A concentração de 0,008% foi testada, admitindo-se que proporcionaria a mesma eficácia das demais concentrações, porém com atenuação de eventuais efeitos colaterais, porquanto em menor concentração, menos seria sua ação sobre os tecidos adjacentes (SCHRAERMEYER et al., 1999).

Empregaram-se coelhos, dadas as facilidades de obtenção, manejo e manutenção, bem como por exibirem as etapas da reparação cicatricial de maneira semelhante às de outras espécies, incluindo-se o homem (CASTRO, 1990).

O músculo reto dorsal foi o escolhido pelo fácil acesso cirúrgico. Utilizou-se fio de poliglactina 910, por ele estar entre os mais empregados na correção cirúrgica do estrabismo. No presente estudo, este fio mostrou-se seguro e eficiente tanto na sutura conjuntival, quanto na mioescleral. Sabe-se que a força tênsil da poliglactina 910 diminui a partir do 15º dia da sua implantação e que o evento decorre da hidrólise e absorção. Nas suturas conjuntival e mioescleral, denotaram-se perda ou absorção do fio entre o 30º e 60º dias do pós-operatório. Não obstante, as qualidades da poliglactina 910 e os cuidados tomados no per-operatório, em um animal do grupo tratado com a mitomicina C à 0,02%, houve deiscência da sutura.

O protocolo em anestesia adotado mostrou-se factível. A associação da xilazina com cetamina foi eficiente, bem como o foi o halotano, em circuito semi-aberto. No todo obteve-se simpleza operacional na manutenção e patência da anestesia.

A instilação do colírio à base de dexametasona associada à neomicina e à polimixina B, foi suficiente para controlar a exsudação e a infecção pós-operatória. Obteve-se boa analgesia pós-operatória com cloridrato de buprenorfina.

Os resultados obtidos, quanto à avaliação clínica, mostraram que a maioria dos animais, de ambos os grupos, exibiu, em algum momento do pós-operatório, sinais de quemose, blefarospasmo, hiperemia conjuntival e secreção ocular mucosa. Olhos do grupo GCN apresentaram maior intensidade de exsudação no pós-operatório imediato, devido à utilização do blefarostato durante a intervenção cirúrgica. Por isso, deixou-se de utilizá-lo nos demais grupos.

No que concerne à quemose, ela se apresentou nas fases agudas do pós-operatório e de forma discreta em todos os animais. Face à sua evolução rápida, acredita-se que tenha decorrido do trauma cirúrgico.

A hiperemia conjuntival evidenciada, principalmente, nos primeiros dias de avaliação, deveu-se, também, ao ato cirúrgico. Áreas ao redor do fio de sutura manifestaram-na de forma mais intensa e duradoura, à similitude do que foi encontrado por DADEYA & KAMLESH (2001). Reconhece-se que a reação inflamatória pode ser ensejada pelo fio de sutura em atrito com as incursões palpebrais. Segundo estes mesmos autores, esta irritação pode ser amenizada substituindo-se a sutura por cola de fibrina.

No cômputo geral, os sinais clínicos, quali-quantificados, não mostraram diferenças entre os grupos, permitindo supor que a mitomicina C, da maneira como foi aplicada no per-operatório, não induz à maior exsudação na superfície do olho, contrariamente ao que fora encontrado por MAMEDE et al. (2004), ao utilizarem-na no pós-operatório, por 14 dias.

O recuo do músculo reto dorsal foi capaz de ensejar hipotropia no olho operado. Os graus de desvio manifestaram-se de forma diferente entre os animais, por serem proporcionais à intensidade do recuo produzido. Esta intensidade foi variável de acordo com a largura do músculo oblíquo dorsal. Ressalta-se que dificuldades foram encontradas para se avaliar o grau de estrabismo dos animais, uma vez que os coelhos

possuem pouca visão binocular e são capazes de movimentar um olho sem interferir com o seu Adelfo.

A dissecação das áreas adjacentes à mioplastia revelaram aderências em todos os olhos avaliados. Da comparação entre os grupos GCN e GCP, não se encontraram diferenças quanto à quantidade e graus de aderência. Tais achados permitem supor que a MMC, segundo o protocolo como foi administrada, não foi absorvida por via sistêmica em níveis capazes de ensejar qualquer efeito nos olhos contralaterais. Os achados corroboram os de MATTAR et al. (1995), que informam que a mitomicina age apenas no local da sua aplicação.

Da comparação entre os grupos GCN e GCP, com os tratados com a MMC (0,008, 0,02 e 0,04%), identificou-se, em quantidade e graus, mais aderência nos controles, em todos os períodos da avaliação. Estes achados somam-se aos de CRUZ & MATKOVICH (1995), CRUZ (1996), OH et al. (1999) e MAHINDRAKAR et al. (2000). Todavia, e a despeito da sua constatação, estatisticamente não se encontraram diferenças, à exceção da comparação entre o grupo GCP e o 0,04%, aos 15 dias de pós-operatório.

Os resultados obtidos contrapõem aos de BROOKS et al. (1996) e de MINGUINI et al. (2000), na medida em que os autores apontam a mitomicina C como substância que não promove profilaxia das aderências, quando aplicada no per-operatório. No entanto, avaliação dos resultados, conduzida por estes autores, deu-se de forma diferente daqueles da presente pesquisa e de demais trabalhos realizados por outros. MINGUINI et al. (2000), por exemplo, avaliaram graus de aderência à morfometria, aferindo áreas formada por granulomas. Observaram, os autores, que a mitomicina C não diminui a gênese de granulomas. Contudo, o procedimento, factível e confiável, não avalia a força necessária para se desfazerem aderências. BROOKS et al. (1996), por sua vez, avaliaram graus de estrabismo, mas não de aderências e observaram que a MMC não diminui a formação do estrabismo após 4 semanas de cirurgia. O estrabismo pode, indiretamente, pressupor haver aderências, contudo, não as confirmam.

Aderências dos grupos tratados com a mitomicina C, nas diferentes concentrações, apresentaram-se de forma semelhante. Da constatação, admite-se que a utilização de concentrações menores induziu aos mesmos efeitos antifibróticos.

Os períodos adotados para avaliação à histologia (15, 30, 60 e 120 dias) foram concebidos com base na experiência de HUARD et al. (2002), os quais afirmaram que a fibrose, durante a reparação muscular, ocorre a partir da segunda semana da injúria e que, aos 120 dias, a reparação já está concluída.

À histologia, a reação inflamatória do tipo granulomatosa e linfocitária, vista nas fases iniciais do pós-operatório, ocorreu à similitude do que fora observado por INGRAM (1965), que estudou, em coelhos, os efeitos produzidos pelo recuo da musculatura extrínseca do olho, utilizando-se náilon como fio de sutura e sem a interferência de qualquer fármaco. Há como admitir, portanto, que o quadro inflamatório observado tenha sido ensejado pelo ato cirúrgico e pela presença do fio de sutura.

O granuloma gerado nas áreas das mioplastias mostrou-se semelhante entre os grupos, nos períodos de 15, 30 e 60 dias da avaliação. Aos 120 dias, houve involução mais lenta do evento, em 50% dos animais tratados com a MMC à 0,02%. Relativamente à fibrose, aos 15 dias observou-se, nos grupos controle, menor incidência do evento, comparativamente aos tratados. No entanto, decorrido o período, houve tendência ao aumento da fibrose nos grupos controle e sua diminuição nos tratados, permanecendo, no final da avaliação (120 dias), semelhante entre os grupos. Da constatação, admite-se que a MMC possa ter retardado a reparação cicatricial no local onde fora depositada, corroborando os resultados encontrados por RIBEIRO et al. (2003), ao estudarem-na na derme de ratos.

A avaliação morfométrica revelou diminuição do volume e da área nucleares nos olhos tratados com a MMC, principalmente no grupo 0,02%. Como a atividade nuclear pode ser estimada por estas medidas (ALBUQUERQUE, 2006, comunicação pessoal), acredita-se que a MMC seja capaz de diminuí-la nas fibras musculares, notadamente à concentração de 0,02%.

No que diz respeito ao perímetro, relação volume / área, excentricidade, coeficiente de forma e do índice de contorno nucleares houve poucas variações entre os grupos, indicando que a MMC não foi capaz de alterar a forma nuclear.

Quanto à quantificação fibroblástica, houve discreta tendência dos grupos tratados em apresentarem-na em menor quantidade, comparativamente aos controle. É possível admitir que a MMC possa interferir com a proliferação fibroblástica, corroborando com os achados de YAMAMOTO et al. (1990), os quais, identificaram, “in vitro”, diminuição da proliferação fibroblástica, após administração da MMC.

Quanto à imunistoquímica, testaram-se diferentes protocolos e dificuldades foram encontradas na marcação dos fibroblastos, notadamente quanto à utilização do Anticorpo Primário (FGF-2), produzido a partir de coelhos. Acredita-se que, por serem o anticorpo (Ac) e o antígeno (Ag) produzidos em coelhos, o complexo Ag-Ac não pôde ser obtido, razão pela qual se substituiu o Anticorpo Primário por outro gerado em cabras. Observou-se, a partir de então, que o Fator de Crescimento Fibroblástico básico (FGF-2) foi expresso em fibroblastos e macrófagos, a exemplo do que fora notificado por FUNATO et al. (1999) e WANG et al. (2001). No presente estudo, a expressão do FGF-2 ocorreu em intensidades muito semelhantes entre os grupos. Esses resultados contrapõem-se ao que fora notificado por OH et al. (1999), cuja expressão foi menor em animais que receberam a MMC. Em se considerando que o FGF-2 é produzido por macrófagos, fibroblastos, mastócitos, linfócitos T e por células endoteliais (KUMAR et al., 2005) e que a MMC age apenas sobre a proliferação fibroblástica (YAMAMOTO et al., 1990), há como admitir que ela pouco interfere com a produção do FGF-2.

V. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, na forma como a pesquisa fora concebida, é factível admitir que a mitomicina C administrada no per-operatório na cirurgia do recuo do músculo reto dorsal do bulbo do olho, por 5 minutos, nas concentrações de 0,008, 0,02 e 0,04%:

- 1- permitiu a ocorrência clínica de menores aderências junto às áreas das mioplastias, contudo não confirmada à estatística;
- 2- proporcionou retardo na reparação cicatricial junto às áreas das mioplastias, notadamente no grupo tratado à concentração de 0,02%, confirmada à microscopia de luz;
- 3- diminuiu a atividade nuclear das fibras musculares, sem interferir com a sua forma.
- 4- não interferiu com a expressão do FGF-2, em qualquer dos momentos da avaliação.
- 5- não foi capaz de ensejar qualquer efeito colateral visibilizável nos animais ao longo da pesquisa.

VI. REFERÊNCIAS

ALVES, M. R.; SALDIVA, P. H. N.; LEMOS, M.; JOSÉ, N.K. Efeitos do uso tópico da mitomicina C no epitélio corneano de coelhas. Análise histológica pela morfometria. **Arq. Bras. Oftalmol.**, São Paulo, v. 59, n. 5, p. 431-437, 1996.

ANDUZE, A. L.; BURNETT, I. M. Indications for and complications of mitomycin C in pterygium surgery. **Ophthalmic Surg. Lasers**, Thorofare, v. 27, p. 667-673, 1996.

ARVO, Association for Research in Vision and Ophthalmology. Sarasota: **National Institutes of Health Publications**. 1985. n.85-23. 4p.

BIKFALVI, A.; SAVONA, C.; PEROLLET, C.; JAVERZAT, S. New insights in the biology of fibroblast growth factor-2. **Angiogenesis**, Philadelphia, v. 1, n. 2, p. 155-173, 1997.

BROOKS, S. E.; RIBEIRO, G. B.; ARCHER, S. M.; ELNER, V. M.; MONTE, M. A. D. Fat adherence syndrome treated with intraoperative mitomycin C: a rabbit model. **J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus**, Thorofare, v. 33, n. 1, p. 21-27, 1996.

CARONES, F.; VIGO, L.; SCANDOLA, E.; VACCHINI, L. Evaluation of the prophylactic use of mitomycin-C to inhibit haze formation after photorefractive keratectomy. **J Cataract Refractive Surg.**, Fairfax, v. 28, p. 2088-2095, 2002.

CASTRO, A. N. B. V. **Estudo experimental do uso de fio de silicone nos estrabismos paralíticos**. 1990. 55 f. Dissertação (Mestrado em Oftalmologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1990.

CORDEIRO, M. F.; REICHEL, M. B.; GAY, J. A.; D'ESPOSITA, F.; ALEXANDER, R. A.; KHAW, P. T. Transforming growth factor-beta1, -beta2, and -beta3 *in vivo*: effects on normal and mitomycin C-modulated conjunctival scarring. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, Saint Louis, v. 40, n. 9, p. 1975-1982, 1999.

CROOKE, S. T.; BRADNER, W. T. Mitomycin C a review. **Cancer Treat. Rev.**, London, v. 3, p. 121-139, 1976.

CRUZ, O. A. Evaluation of mitomycin to limit postoperative adhesions in strabismus surgery. **J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus**, Thorofare, v. 33, p. 89-92, 1996.

CRUZ, O. A.; MATKOVICH, L. Effects of intraoperative topical mitomycin C on strabismus surgery in the rabbit: a preliminary study. **Ophthalmic Surg.**, v. 26, n.3, p. 237-240, 1995.

DADEYA, S.; FATIMA, S. Corneoescleral perforation after pterygium excision and intraoperative mitomycin C. **Ophthalmic Surg. Lasers Imaging**, Thorofare, v. 34, p. 146-148, 2003.

DADEYA, S.; KAMLESH, M. S. Strabismus surgery: fibrin glue versus vicryl for conjunctival closure. **Acta Ophthalmol. Scand.**, Copenhagen, v.79, p. 515-517, 2001.

DOUGHERTY, P. I.; HARDTEN, D. R.; LINDSTROM, R. L. Corneal scleral melt after pterygium surgery using a single intraoperative application of mitomycin C. **Cornea**, London, v. 15, p. 537-540, 1996.

ELSAS, F. J.; GOWDA D. C.; URRY, D. W. Synthetic polypeptide sleeve for strabismus surgery. **J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus**, Thorofare, v. 29, p. 284-286, 1992.

FUNATO, N.; MORIYAMA, K.; BABA, Y.; KURODA, T. Evidence for apoptosis induction in myofibroblasts during palatal mucoperiosteal repair. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 78, n. 9, p. 1511-1517, 1999.

GOLDIM, J. R. **Pesquisa em saúde e direitos dos animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995, 28p.

HEAPS, R. S.; NORDLUND, J. R.; GONZALEZ, F. F.; REDICK, J. A.; CONWAY, B. P. Ultrastructural changes in rabbit ciliary body after extraocular mitomycin C. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, Saint Louis, v. 39, n. 10, p. 1971-1975, 1998.

HELAL, M.; MESSIHA, N.; AMAYEM, A.; EL-MAGHRABY, A.; ELSHERIF, Z.; DABEES, M. Intraoperative mitomycin C versus postoperative topical mitomycin C drops for the treatment of pterygium. **Ophthalmic Surg. Lasers**, Thorofare, v. 27, n. 8, p. 674-678, 1996.

HELVESTON, E. M.; CALLAHAN, M. A. Synthetic absorbable suture for strabismus surgery. **Am. J. Ophthalmol.**, Chicago, v. 82, n. 2, p. 300-302, 1976.

HUARD, J.; LI, Y.; FU, F. Muscle injuries and repair: current trends in research. **J. Bone Jt. Surg.**, Boston, v. 84-A, n. 5, p. 822-832, 2002.

HWANG, J.; CHANG, B. L. Use of physical barriers for delay adjustable strabismus surgery: the effect of Interceed and polyglactin 910 mesh. **Br. J. Ophthalmol.**, London, v. 80, p. 759-762, 1996.

HWANG, J.; CHANG, B. L. Combined effect of Interceed and 5-fluorouracil on delayed adjustable strabismus surgery. **Br. J. Ophthalmol.**, London, v. 83, p. 788-791, 1999.

INGRAM, R. M. Tissue repair after the operations of recession and resection. **Br. J. Ophthalmol.**, London, v. 49, p. 18-28, 1965.

KASEMKIJWATTANA, C.; MENETREY, J.; BOSCH, P.; SOMOGYI, G.; MORELAND, M. S.; FU, F. H.; BURANAPANITKIT, B.; WATKINS, S. S.; HUARD, J. Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, Philadelphia, v. 370, p. 272-285, 2000.

KAWAI, K.; SUZUKI, S.; TABATA, Y.; NISHIMURA, Y. Accelerate wound healing through the incorporation of fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis using a pressure-induced decubitus ulcer model in genetically diabetic mice. **Br. J. Plast. Surg.**, Edinburgh, v. 58, p.1115-1123, 2005.

KAWASE, K.; MATSUSHITA, H.; YAMAMOTO, T.; KITAZAWA, Y. Mitomycin concentration in rabbit and human ocular tissue after topical administration. **Ophthalmol.**, London, v. 99, n. 2, p. 203-207, 1992.

KOHN, D. F.; WIXSON, S. K.; WHITE, W. J.; BENSON, G. J. **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 426.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran pathologic bases of disease**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.

KUNITOMO, N.; MORI, S. Study on the pterigium: part IV, a treatment of the pterigium by mitomycin C instillation. **Acta Soc. Ophthalmol. Jpn.**, Tokyo, v. 67, p. 601-607, 1969.

LAVAL, J. The use of absorbable gelatin film (Gelfilm) in ophthalmic surgery. **N. Y. Med. J.**, Nova York, v. 58, p. 2399-2401, 1958.

LEE, D. A.; LEE, T. C.; CORTES, A. E.; KITADA, S. Effects of Mithramycin, Mitomycin, Daunorubicin and Bleomycin on human subconjunctival fibroblast attachment and proliferation. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, Saint Louis, v. 31, p. 2136-2144, 1990.

MAHINDRAKAR, A.; TANDON, R.; MENON, V.; SHARMA, P.; KHOKHAR, S. Effectiveness of mitomycin C in reducing reformation of adhesions following surgery for restrictive strabismus. **J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus**, Thorofare, v. 38, p. 131-135, 2001.

MAMEDE, F. V.; LAUS, J. L.; CABRAL, V. P.; VICENTI, F. A. M.; BARBIERI-NETO, J. Use of topical mitomycin C in myoplasty of the medial rectus muscle of rabbits. **Vet. Ophthalmol.**, Gainesville, v. 7, n. 5, p. 335-342, 2004.

MANNING, C. A.; KLOESS, P. M.; DIAZ, M. D.; YEE, R. W. Intraoperative mitomycin in primary pterygium excision. A prospective, randomized trial. **Ophthalmol.**, Rochester, v. 104, p. 844-848, 1997.

MATTAR, D. B.; ALVES, M. R.; SILVA, M. H. T.; JOSÉ, N. K. Estudo da influência da aplicação subconjuntival da mitomicina C na reparação de defeito epitelial corneano, em coelhas. **Arq. Bras. Oftalmol.**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 65-67, 1995.

MINGUINI, N.; CARVALHO, K. M.; AKAISHI, P.; DELUCA, I. Histologic effect of mitomycin C on strabismus surgery in the rabbit. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, Saint Louis, v. 41, p. 3399-3401, 2000.

MITRE, J.; BONOMO, P. P.; FARAH, M. E.; CURSINO, W. Ação da mitomicina C nas estruturas intraoculares de coelhos. **Arq. Bras. Oftalmol.**, São Paulo, v. 59, n. 1, p. 37-43, 1996.

OBARA, K.; ISHIHARA, M.; FUJITA, M.; KANATANI, Y.; HATTORI, H.; MATSUI, T.; TAKASE, B.; OZEKI, Y.; NAKAMURA, S.; ISHIZUKA, T.; TOMINAGA, S.; HIROI, S.; KAWAI, T.; MAEHARA, T. Acceleration of wound healing in healing-impaired db/db mice with a photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2. **Wound Repair Regen.**, Saint Louis, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2005.

OH, S. Y.; PARK, D. W.; CHANG, B. L. The effect of mitomycin C on the healing process in rabbit extraocular muscle surgery. **Ophthalmic. Surg. Laser**, Thorofare, v. 30, n. 4, p. 305-309, 1999.

OHTSUKI, H.; HASEBE, S.; OKUDA, Y.; OGOU, T. Is mitomycin C effective in preventing muscle migration after hang-back recession in a rabbit model? **Ophthalmologica**, Basel, v. 211, p. 373-3799, 1997.

PARKS, M. M. **Atlas of strabismus surgery**. Philadelphia: Harper and Row, 1983. p.189.

RIBEIRO, F. A. Q.; BORGES, J. P.; ZACCHI, F. F. S.; GUARALDO, L. O comportamento clínico e histológico da pele do rato submetida ao uso tópico e injetável da mitomicina C. **Rw. Bras. Otorrinolaringol.**, Rio de Janeiro, v. 69, n. 2, p. 151-158, 2003.

RUBINFELD, R. S.; STEIN, R. M. Topical mitomycin C for pterygia: is single application appropriate? **Ophthalmic. Surg. Lasers**, Thorofare, v. 28, p. 662-669, 1997.

RUBINFELD, R. S.; PFISTER, R. R.; STEIN, R. M.; FOSTER, C. S.; MARTIN, N. F.; STOLERU, S.; TALLEY, A. R.; SPEAKER, M. G. Serious complications of topical mitomycin C after pterygium surgery. **Ophthalmology**, Rochester, v. 99, p. 1647-1654, 1992.

SAFIANIK, B.; BEN-ZION, I.; GARZOZI, I. L. I. Serious corneoscleral complications after pterygium excision with mitomycin C. **Br. J. Ophthalmol.**, London, v. 86, p. 357-358, 2002.

SANDERSON, B. J. S.; SHIELD, A. J. Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 355, p. 41-57, 1996.

SCHRAERMAYER, U.; DIESTELHORST, M.; BIEKER, A.; THEISOHN, M.; MIETZ, H.; USTUNDAG, C.; JOSEPH, G.; KRIEGLSTEIN, G. K. Morphologic proof of the toxicity of mitomycin C on the ciliary body in relation to different application methods. **Graefe's Arch. Clin. Expl. Ophthalmol.**, Berlin, v. 237, p. 593-600, 1999.

SILVA, L. H. **Transplante autólogo, homotópico, livre, de músculo ocular extrínseco com e sem uso de anti-adesivo: estudo experimental.** 1983. 56 f. Dissertação (Mestrado em Oftalmologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1983.

TSAI, Y. Y.; LIN, I. M.; SHY, I. D. Acute scleral thinning after pterygium excision with intraoperative mitomycin C: a case report of scleral dellen after hare sclera technique and review of the literature. **Cornea**, London, v. 21, p. 227-229, 2002.

URBAN, R. C.; KAUFMAN L. M. Mitomycin in the treatment of hipertrophic conjunctival scars after strabismus surgery. **J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus**, Thorofare, v. 31, p. 96-98, 1994.

WAKAKI, S.; MARUMO, H.; TORNOIKA, K. Isolation of new fractions of antitumoral mitomycins. **Antibiot. Chemother.**, Basel, v. 8, p. 228-240, 1958.

WANG, H. J.; RUAN, H. G.; HUANG, G. Z. A preliminary study on the changes of expression of PDGF-beta, PDGFR-beta, TGF-beta 1, TGFR, bFGF and its relationship

with the wound age in wound healing. **Fa Yi Xue Za Zhi**, Pekin, v. 17, n. 4, p. 198-201, 2001.

YAMAMOTO, T.; VARANI, J.; SOONG, H. K.; LICHTER, P. R. Effects of 5-fluorouracil and mitomycin C on cultured rabbit subconjunctival fibroblasts. **Ophthalmology**, Rochester, v. 97, p. 1204-1210, 1990.

ZIMMERMAN, T. J.; KOONER, K. S.; SHARIR, M.; FECHTNER, R. D. **Textbook of ocular pharmacology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p. 895.