



## Uso do meio Roswell Park Memorial Institute como conservante de córneas de camundongos Swiss

*[Use of the Roswell Park Memorial Institute medium as a preservative in Swiss mouse corneas]*

<sup>1</sup>FJX Lira, <sup>2</sup>FB Sá

### "Artigo Científico/Scientific Article"

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil;

<sup>2</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil.

---

#### Resumo

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

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

#### Abstract

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

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

---

#### Introdução

A principal função do endotélio da córnea é oferecer uma barreira para que a córnea mantenha a sua transparência. Estas funções são atingidas graças às junções

aderentes e bombas especializadas que impedem o edema estromal. Como a célula endotelial tem uma reduzida capacidade de proliferação, qualquer enfermidade ou trauma que a danifique induzirá um

---

(\*)Autor para correspondência/Corresponding author : e-mail: crleucas@yahoo.com Fone: (81) 3320 6348

Recebido em: 30 de abril de 2012.

Aceito em: 30 de maio de 2012.

alongamento compensatório das células remanescentes, podendo inclusive estar associado à disfunção celular (LANG, 1976).

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

Meios de cultura de tecidos são usados para preservação de córnea principalmente na Europa. Esta abordagem consiste em manter o tecido em um meio de cultura suplementado com soro fetal bovino, antibióticos e antimicóticos em uma temperatura de 31 a 37°C. O propósito destes meios é o de manter o metabolismo e a viabilidade o mais semelhante possível às condições fisiológicas. Nestas condições a córnea poderá ser preservada por até 35 dias; porém, o método é tecnicamente mais difícil, requerendo cuidados com controle de contaminação e necessidade de um tempo antes do transplante para desidratação corneana, para o restabelecimento da condição original. (HE et al., 2011) Ceratoplastias penetrantes representam as cirurgias de transplante mais empregadas mundialmente na oftalmologia humana. Os custos dos meios de conservação industrializados ainda são elevados, principalmente em nossa região (NOGUEIRA e VASCONCELOS, 2000), e na medicina veterinária. Com isso, ressalta-se a necessidade de novos estudos com meios de preservação de baixo custo e eficientes, para

que as terapias com transplantes ou enxertos se tornem viáveis e rotineiras na oftalmologia veterinária. O propósito deste estudo foi investigar o meio de cultura de tecidos RPMI como forma de preservação de córneas de camundongos mantidas sob refrigeração e avaliadas por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura.

### **Material e Métodos**

Foram utilizados 10 camundongos albinos (SWISS) machos com 45 dias de idade, provenientes do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do Ministério da Agricultura em Recife-PE, Brasil. Os animais foram mantidos em nossa instituição (Procurar ser impessoal e não utilizar a primeira pessoa. Seria melhor substituir esse local pelo nome da instituição.) em gaiolas plásticas, tendo o ambiente com temperatura e umidade controladas e sob regime de iluminação cíclica (12 h escuro, 12 h claro), com intensidade de luz  $\leq 100$  LUX, até a execução deste trabalho. Todos os experimentos animais foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco e com o Estatuto para o Uso de Animais em Pesquisa Oftálmica e Visão da ARVO.

Os animais foram divididos em dois grupos, um com córneas a serem mantidas em meio RPMI (n=5) e outro, servindo como controle (n=5), com córneas preservadas em meio comercial padrão Optisol GS®. Para cada animal foi estabelecido que apenas a córnea esquerda seria utilizada no protocolo experimental, ficando as córneas direitas como padrão e controle de integridade estrutural para ambos os grupos. Os camundongos foram profundamente anestesiados com Cloridrato de Cetamina (100mg/Kg - Vetencol®) e Cloridrato de Xilazina (20mg/Kg - Rompun®), e submetidos à eutanásia pelo aprofundamento anestésico com Pentobarbital sódico. Todos os fármacos foram aplicados por via intraperitoneal.

Após a eutanásia, foi procedido um exame oftálmico *post mortem* com o auxílio de um oftalmoscópio direto (Heine®),

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

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

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

2,5% em tampão fosfato e encaminhadas ao Laboratório do Aggeu Magalhães onde foram metalizadas e fotodocumentadas em microscópio eletrônico de varredura.

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

### **Resultados e Discussão**

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

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

A endoftalmite é uma séria complicação da ceratoplastia penetrante (HASSAN e WILHELMUS, 2005; ZANETTI et al., 2005; WILHELMUS e HASSAN, 2007). A infecção pode ser causada pela contaminação pré-operatória da córnea doadora, condições inadequadas de

asepsia durante a cirurgia e fatores ligados (EVERTS et al., 2001; REHANY et al., 2004). Apesar da transmissão esporádica de bactérias e fungos aos receptores de córnea, tem-se demonstrado que os micro-organismos causadores de endoftalmite geralmente derivam das córneas doadoras (WING CHU, 2000; EVERTS et al., 2001; ZANETTI et al., 2005; WILHELMUS e HASSAN, 2007), repercutindo de maneira negativa e grave na visão do receptor (WING CHU, 2000). Os cocos gram-positivos são os contaminantes mais identificados nos tecidos corneanos utilizados para transplante e são responsáveis pelos casos de endoftalmite pós-operatória (KAPUR et al., 2006).

aos pacientes que recebem as córneas

Em todas as amostras deste estudo, apenas uma apresentou contaminação por *Staphylococcus* sp. Por se tratar de um agente comumente encontrado em pele, acredita-se que ocorreu uma falha durante o processo de coleta desta amostra e/ou no seu envio ao laboratório.

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

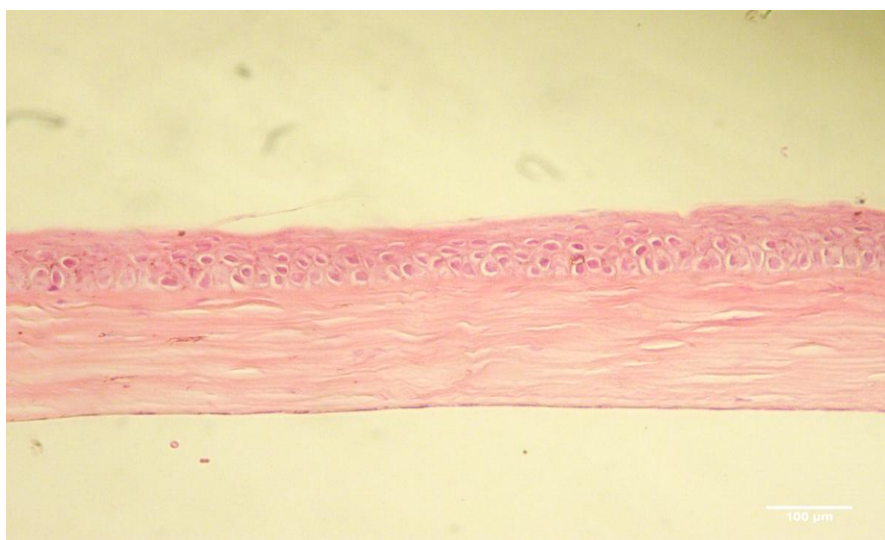


Figura 1. Fotomicrografia da córnea controle de camundongo em corte transversal corada em H.E. Identificar as camadas corneanas.

Em ambos os grupos de córneas preservadas, no quarto dia, o epitélio corneano manteve-se aderido ao estroma anterior. Porém, o grupo preservado em RPMI apresentou extensas alterações intra e extracelulares, como degeneração hidrópica, edema e picnose nuclear. Isto leva a crer que a ausência de agentes hiperosmóticos como o dextran e o sulfato de condroitina A, importantes na adesão celular, tenha provocado tais

alterações (GORDON et al., 1984). Quando comparado aos resultados do meio comercial Optisol GS, apenas a camada mais superficial do epitélio, formada por células escamosas, apresentava-se irregular e com perdas de células (Fig. 2). Estudos têm demonstrado que a baixa temperatura produz tais como consequência da depleção do ATP, causando dissociação das junções intercelulares mudanças funcionais nos tecidos,

principalmente nos complexos juncionais como consequência da depleção do ATP, causando dissociação das junções (MANDEL et al., 1993; KOMURO, 1999).

Nos últimos anos, os estudos mostraram que a parte mais anterior da córnea pode ser utilizada para enxertos lamelares nas correções de ulcerações e a perda da camada mais externa do epitélio, as células

escamosas, não altera os resultados (CHEN, 2010). No sétimo dia, as córneas preservadas apresentaram mudanças estruturais, como um aumento em sua espessura total (Fig. 2A), desorganização do colágeno, rupturas celulares e destruição de epitélio e endotélio. No grupo do Optisol GS® (Fig. 2B), como esperado, a córnea ainda mantém sua forma.

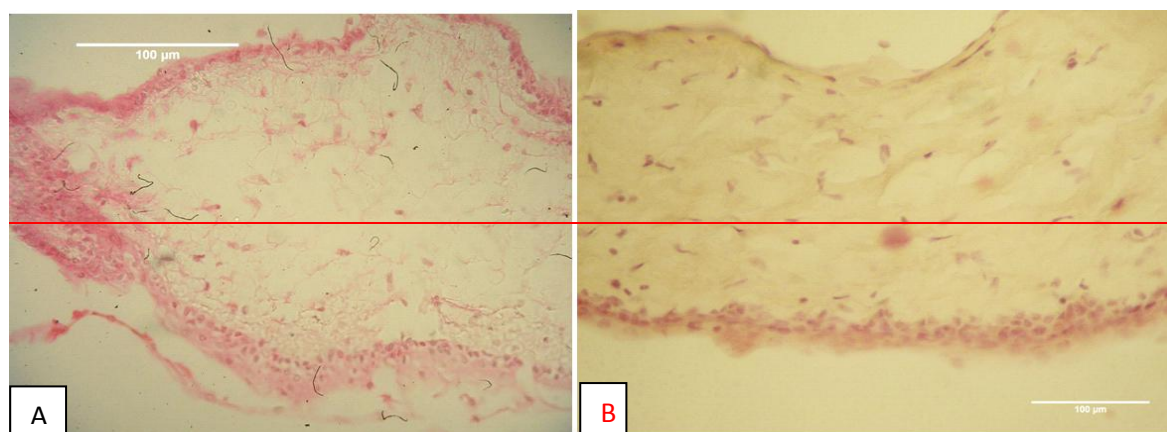


Figura 2. Fotomicrografia da córnea de camundongo em corte transversal corada em H.E. mantidas em conservante por sete dias, em RPMI (A) e Optisol GS® (B). Em A, observa-se uma desorganização estrutural e completa alteração da forma padrão corneana, o que não ocorre em B.

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

provavelmente devido ao meio não apresentar concentrações satisfatórias de substâncias antioxidantes. Este será o último parágrafo do item “resultados e discussão”.

Os resultados mostraram que, aos quatro dias nas córneas mantidas em RPMI, a camada endotelial apresentava perdas de células e deformação do estroma subjacente (Fig.3). A microscopia eletrônica pode revelar não só a perda das células, mas também a mudança de sua forma (pleomorfismo), alongamento (polimegatismo), aumento da porosidade em suas paredes e destruição de grande parte de suas vilosidades ou projeções polipodais (Fig. 4 e 5).

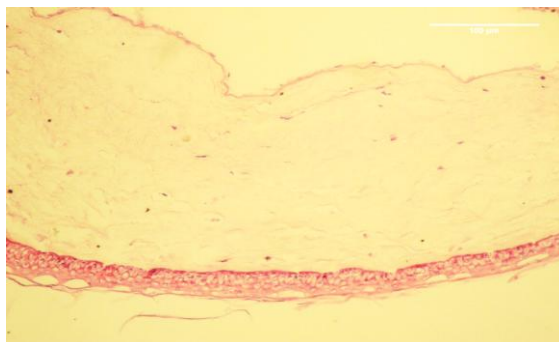


Figura 3. Córnea de camundongo em corte transversal, corada em H.E. Após quatro dias em RPMI, evidenciando a perda das células endoteliais.

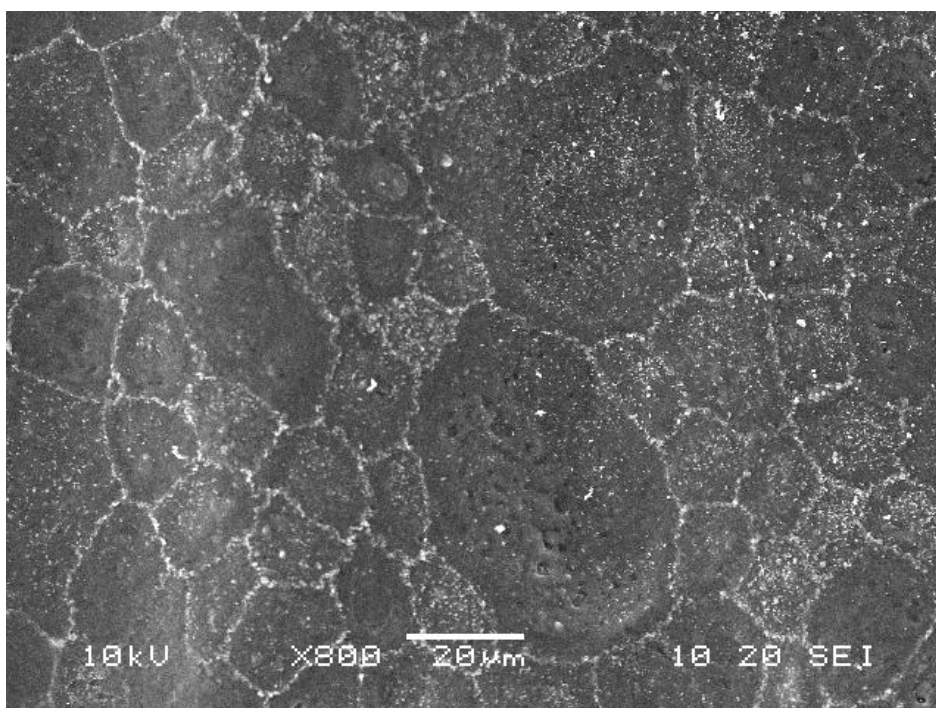


Figura 4. Eletromicrografia de varredura do endotélio corneano de camundongo (córnea mantida por quatro dias em meio RPMI). Evidenciam-se células de padrão irregular quanto ao tamanho e projeções na região de junção. Identificar com setas.

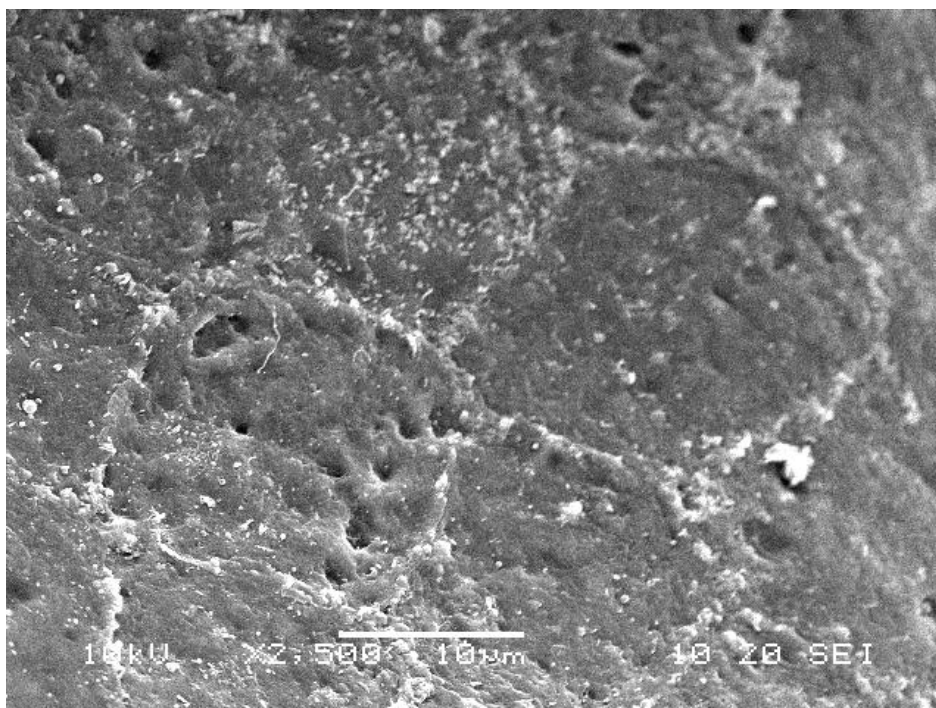


Figura 5. Eletromicrografia de varredura do endotélio corneano de camundongo (córnea mantida por quatro dias em meio RPMI). Evidenciam-se sinais de destruição celular como aumento de sua porosidade, e alongamento de suas projeções polipodais.

### **Conclusões**

Embora as córneas mantidas em RPMI tenham apresentado uma quase que completa descelularização, tornando-as inadequadas para o transplante total ou ceratoplastia penetrante, estudos recentes têm demonstrado matriz extracelular têm o poder de ativar a diferenciação e migração de células tronco residentes no limbo, promovendo a regeneração da lesão (HASHIMOTO et al., 2010). Por que está com essa referência? A conclusão não deve ter referência, pois é justamente a finalização do estudo. A conclusão deve ser dos autores do trabalho

em questão, deve conter a conclusão atingida após a realização e a finalização do estudo. que córneas descelularizadas têm bons resultados, uma vez que não há ativação imunogênica do receptor. Além disso, segundo especulação dos autores, os enxertos corneanos intralamelares feitos com apenas

### **Agradecimentos**

A CAPES, por ter possibilitado os meios necessários à pesquisa. À Universidade Federal Rural de Pernambuco, por meio do Departamento de Medicina Veterinária, por todo o conhecimento ministrado por seus professores e pela colaboração encontrada durante todo o curso.

## Referências

- ANDREW, S. E., SAMUELSON, D. A., LEWIS, P. A. & KUBILIS, P. S. Comparison of Optisol-GS and neomycin-polymyxin B-gramicidin ophthalmic solution for corneal storage in the dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, p. 155–161, 1999.
- CHEN W, LIN Y, ZHANG X, et al. Comparison of fresh corneal tissue versus glycerin-cryopreserved corneal tissue in deep anterior lamellar keratoplasty. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v. 51, p.775–781. 2010.
- EVERTS, R. J.; FOWLER, W. C.; CHANG, D. H.; RELLER, L. B. Corneoscleral rim cultures - lack of utility and implications for clinical decision-making and infection prevention in the care of patients undergoing corneal transplantation. **Cornea**, v. 20, n. 6, p. 586–589, 2001.
- GORDON, P. B.; JENKINS, C. S.; HATCHER, V. B. The effect of extracellular matrix in the detachment of human endothelial cells. **J. Cell Physiol.**, v.121, p.467, 1984.
- HASHIMOTO, Y.; FUNAMOTO, S; SASAKI, S; HONDA, T.; HATTORI, S.; NAM, K.; KIMURA, T.;MOCHIZUKI, M; FUJISATO, T.; KOBAYASHI, H.; KISHIDA, A.Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. **Biomaterials**. v. 31, p. 3941–3948. 2010.
- HASSAN, S. S.; WILHELMUS, K. R. Eye-banking risk factors for fungal endophthalmitis compared with bacterial endophthalmitis after corneal transplantation. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, n. 4, p. 685–690, 2005.
- HE, J.; KAKAZU, A. H.; BAZAN, N.G.; BAZAN, H.E.P. Aspirin-Triggered Lipoxin A4 (15-epi-LXA4) Increases the Endothelial Viability of Human Corneas Storage in Optisol-GS. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics** Vol. 27, 3, 2011
- JENG, B. H. Preserving the cornea: corneal storage media. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 17, p. 332–337, 2006.
- KAPUR, R.; TU, E. Y.; PENDLAND, S. L.; FISCELLE, R.; SUGAR, J. The effect of temperature on the antimicrobial activity of Optisol-GS. **Cornea**, v. 25, p. 319–324, 2006.
- KOMURO, A., HODGE, D. O., GORES, G. J., BOURNE, W. M. Cell death during corneal storage at 4° C. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, p. 2827–2832, 1999.
- LANG, R.A. et al. Changes in the corneal endothelium as a function of age. **Experimental eye Research**. Vol. 22, p. 587-594, 1976.
- LINDSTROM, R.L., KAUFMAN, H.E., SKELNIK, D.L., et al. Optisol corneal storage medium. **Am. J. Ophthalmol.** 114:345–356,1992.
- MANDEL L.J.; BACALLAO R.; ZAMPIGHI G. Uncoupling of the molecular‘fence’ and Para cellular ‘gate’ functions in epithelial tight junctions. **Nature.**; v.3, p.552–555,1993
- MEISLER, D. M.; KOECK, T.; CONNOR, J. T.; AULAK, K. S.; JENG, B. H., HOLLYFIELD, J. G.; STUEHR, D. J.; SCHADRACH, K. G. Inhibition of nitric oxide synthesis in corneas in storage media. **Experimental Eye Research**, v. 78, p. 891–894, 2004.
- PELS, L. Organ culture: the method of choice for preservation of human donor corneas. **British Journal Ophthalmology**, v. 81, p. 523–525, 1997.
- PEREIRA, M. L. M.; SANTOS, A. M. C.; PASSOS, M. C.; PECEGO, J. G. Análise comparativa entre os bancos de olhos brasileiros: da preservação à distribuição da córnea doada. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 61, n. 3, p. 169–172, 2002.
- PRINSEN, M.K.; SCHIPPER, M.E.I.; WIJNANDS, M.V.W. Histopathology in the isolated chicken eye test and comparison of different stainings of the cornea **Toxicology in Vitro**. v. 25, p.1475–1479, 2011.
- RAUEN, U.; KERKWEG, U.; WUSTEMAN, M. C. Cold-induced injury to porcine corneal endothelial cells and its mediation by chelatable iron – implications for corneal preservation. **Cornea**, v. 25, p. 68 – 77, 2006.
- REHANY, U.; BALUT, G.; LEFLER, E., RUMELT, S. The prevalence and risk factors for corneal donor button contamination and its association with ocular infection after transplantation. **Cornea**, v. 23, n. 7, p. 649–654, 2004.