

# Estudo experimental do meio de conservação de córneas de McCarey-Kaufman modificado\*

JOSÉ AMÉRICO BONATTI<sup>1</sup>; SAMIR JACOB BECHARA<sup>2</sup>; NEWTON KARA JOSÉ<sup>3</sup>; JORGE ALBERTO FONSECA CALDEIRA<sup>4</sup>

## INTRODUÇÃO

Este trabalho relata o estudo experimental em córneas de coelhos e córneas humanas da eficácia do meio de conservação de córneas de McCarey-Kaufman modificado produzido na Divisão de Farmácia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (meio "MKM-HC").

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1) Verificação da eficácia do meio em córneas de coelhos:

Foram utilizados 10 olhos de 5 coelhos albinos adultos, de 2 a 3 kg, imediatamente após o sacrifício dos mesmos. Todos os olhos foram manipulados em sala cirúrgica, com técnica asséptica e atraumática. Previamente à manipulação cirúrgica, todos os olhos foram irrigados gota a gota com 20 ml de solução de gentamicina na concentração de 15 mg/ml em soro fisiológico.

Foram removidos 8 botões córneo-esclerais, deixando-se 2 mm de esclera ao redor da córnea. Estes botões córneo-esclerais foram, imediatamente após a retirada, colocados individualmente em recipientes fechados contendo, cada um, 20 ml do meio "MKM-HC" e armazenados em geladeira a 4°C por 96 horas. No quinto coelho foi feita enucleação de um dos olhos, o qual foi mantido em recipiente fechado formando câmara úmida, repousando sobre gaze embebida em solução salina balanceada com gentamicina na concentração de 15 mg/ml, com a córnea voltada para a parte superior do recipiente e armazenado em geladeira a 4°C por 96 horas, servindo de controle comparativo com o método de conservação de córneas no meio "MKM-HC" a 4°C por 96 horas. O outro olho deste mesmo coelho foi submetido à retirada do botão córneo-escleral, tendo sido o endotélio desta córnea submetido a estudo histológico imediatamente após a retirada, servindo como controle histológico de endotélio normal. Após 96 horas o olho inteiro conservado em câmara úmida teve retirado o botão córneo-escleral e esta córnea, juntamente com as outras 8 conservadas no meio "MKM-HC" por 96 horas, foram estudadas histologicamente.

O estudo histológico do endotélio corneano foi feito utilizando-se o corante vital azul tripan a 1%, que cora o núcleo de células inviáveis<sup>3, 6</sup>. Este método<sup>1</sup> consiste em colocar o botão córneo-escleral sobre uma placa de Petri e pingar algumas gotas de corante até cobrir a face endotelial da córnea, deixando-se por 1 minuto o corante e depois lavando-se suavemente o botão córneo-escleral em solução salina balanceada até a remoção de todo o excesso de corante. Imediatamente após, a córnea é colocada numa placa de Petri com a face endotelial voltada para cima e estudada histologicamente no microscópio óptico.

Foram feitas fotografias das áreas centrais das córneas, sob aumento 100 vezes do microscópio óptico e, após a

projeção em tela dos diapositivos correspondentes a cada córnea, fez-se a contagem das células endoteliais com os núcleos corados, expressando-se o resultado em porcentagem de células endoteliais com os núcleos corados em relação ao número total de células do campo correspondente a cada córnea. O resultado foi colocado na tabela 1. As células com os núcleos corados situadas em regiões de dobras do endotélio corneano e dispostas em fileiras não foram consideradas na contagem.

### 2) Verificação da eficácia do meio em córneas humanas:

Foram utilizadas 4 córneas humanas de cadáver de 2 doadores adultos jovens (de 16 a 18 anos), tendo sido colhidos os botões córneo-esclerais, com 2 mm de esclera ao redor da córnea, nas primeiras 4 horas após o óbito, em sala cirúrgica, com técnica asséptica e atraumática. Previamente à manipulação cirúrgica, todos os olhos foram irrigados gota a gota com 20 ml de solução de gentamicina na concentração de 15 mg/ml em soro fisiológico. Imediatamente após a retirada, os botões foram colocados individualmente em recipientes fechados contendo, cada um, 20 ml de meio "MKM-HC" e logo a seguir armazenados em geladeira a 4°C por 96 horas.

Imediatamente após este período, as córneas tiveram as suas superfícies endoteliais estudadas histologicamente através do mesmo método descrito no item 1 e o resultado colocado na tabela 1.

## RESULTADOS

Os resultados são apresentados na tabela 1.

## DISCUSSÃO

O teste de coloração vital com azul tripan e correntemente usado para se determinar a viabilidade do endotélio corneano. A córnea corada que apresente o teste de viabilidade satisfatório pode, inclusive, ser, ela própria, utilizada no transplante. Contudo, o mais usual entre os que empregam este teste rotineiramente na prática cirúrgica é utilizar a córnea contralateral não submetida ao teste, que se admite comportar-se-ia de maneira semelhante à da córnea testada<sup>1, 2</sup>.

A viabilidade é determinada avaliando-se a porcentagem de células endoteliais não coradas pelo azul tripan (que cora o núcleo de células inviáveis) em relação ao número total de células do campo central da córnea. A visualização das células endoteliais não coradas é difícil pela sua tênue delimitação, exigindo exame cuidadoso, com boa focalização e iluminação do microscópio<sup>6</sup>.

Os critérios de viabilidade do endotélio corneano variam na literatura. STOCKER (1970) considera 70% a viabilidade mínima para transplante<sup>6</sup>. CASEY & MAYER (1984) rela-

\* Do Laboratório de Investigação em Oftalmologia (nº 33) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

1 Médico Colaborador do HCFMUSP e Assistente do HU-USP

2 Médico Assistente

3 Professor Adjunto da USP e Titular da UNICAMP

4 Professor Titular da USP

tam a não utilização do disco de córnea quando mais que 5% das células endoteliais estão com os núcleos corados pelo azul tripan (viabilidade maior ou igual a 95%)<sup>1</sup>. PELS & SUCHARD (1986) admitem uma perda celular máxima de 20% (viabilidade maior ou igual a 80%) como critério de aceitação de uma córnea para transplante<sup>4</sup>.

O trauma decorrente de manipulação da córnea provoca o aparecimento de fileiras de células endoteliais com os núcleos corados<sup>5</sup>, o que pode ocorrer também sobre áreas de dobras corneanas<sup>5, 6</sup>. Por isso, neste trabalho, áreas de células endoteliais com os núcleos corados dispostas em fileiras ou sobre dobras endoteliais não foram consideradas na contagem de células inviáveis. Estes fatos foram observados nas áreas periféricas de algumas das córneas estudadas.

Em córneas removidas de maneira atraumática, poucas células endoteliais aparecem com os núcleos corados, isoladas ou em pequenos grupos e distribuídas de maneira uniforme no endotélio<sup>5</sup>.

TABELA 1

Apresenta as porcentagens de células endoteliais com os núcleos corados por azul tripan a 1% (células inviáveis), com as diferentes técnicas de conservação empregadas

	Porcentagem de células endoteliais com os núcleos corados
Córnea estudada imediatamente após a retirada (controle normal) .....	1,0%
Córnea de olho conservado inteiro em câmara úmida a 4°C por 96 horas .....	38,0%
Córneas de coelhos conservadas no meio "MKM-HC" a 4°C por 96 horas:	
Córnea 1 .....	0,0%
Córnea 2 .....	0,0%
Córnea 3 .....	1,0%
Córnea 4 .....	1,0%
Córnea 5 .....	5,0%
Córnea 6 .....	0,0%
Córnea 7 .....	0,5%
Córnea 8 .....	2,0%
Córneas humanas conservadas no meio "MKM-HC" a 4°C por 96 horas:	
Córnea 1 .....	1,5%
Córnea 2 .....	2,0%
Córnea 3 .....	2,0%
Córnea 4 .....	1,5%

Neste estudo, observou-se um percentual de células endoteliais com os núcleos corados de 1% na córnea fresca de coelho utilizada como controle normal. Nas córneas de coelhos conservadas durante 96 horas a 4°C no meio "MKM-HC" tivemos percentuais de células endoteliais com os núcleos corados variando de 0,0% a 5,0%, com média de 1,2%. As córneas humanas conservadas por 96 horas a 4°C no meio "MKM-HC" tiveram os percentuais de células endoteliais com os núcleos corados variando de 1,5% a 2,0%, com média de 1,75%.

Vemos, portanto, que tanto as córneas de coelhos como as córneas humanas conservadas por 96 horas a 4°C no meio de conservação de córneas de McCarey-Kaufman mo-

dificado produzido na Divisão de Farmácia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (meio "MKM-HC") satisfizeram os critérios de viabilidade mínima para transplante. Por outro lado, a córnea do olho de coelho conservado em câmara úmida a 4°C por 96 horas apresentou um percentual de células endoteliais coradas de 38,0%, estando, deste modo, fora dos critérios mínimos de viabilidade para transplante.

## CONCLUSÃO

Após o desenvolvimento de tecnologia necessária à produção e conseqüente fabricação do meio de conservação de córneas de McCarey-Kaufman modificado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foi feito o teste deste meio na conservação de córneas de coelhos e córneas humanas, tendo sido provada sua eficácia na conservação de córneas para transplantes por um período de até 96 horas.

O meio de conservação de córneas de McCarey-Kaufman modificado produzido no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, está, portanto, dentro dos padrões estabelecidos na literatura quanto à sua eficácia experimental, permitindo, assim, que se inicie seu estudo clínico na conservação de córneas para serem transplantadas em pacientes.

## RESUMO

Este trabalho relata o estudo experimental do meio de conservação de córneas de McCarey-Kaufman modificado produzido no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (meio "MKM-HC") na conservação de córneas de coelhos e humanas, tendo-se demonstrado a eficácia deste meio na conservação destas córneas para transplantes por um período de até 96 horas.

## SUMMARY

The authors report an experimental study with the modified McCarey-Kaufman medium, produced at the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, for rabbit and human corneal preservation. It is shown to be efficient for corneal preservation up to 96 hours.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASEY, T. A. & MAYER, D. J. — The organisation of an eye bank. In: CASEY, T. A. & MAYER, D. J. *Corneal Grafting*. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1984: p. 81.
- MEIJIDE, R. E. F.; TRONCOSO, V. V.; MALBRAN, E. — Determinación de la viabilidade endotelial en las queratoplastias perforantes. *Arch. Oftal. B. Aires*, 45: 143-152, 1970.
- NYBERG, M. A.; PEYMAN, G. A.; McENERNEY, J. K. — Evaluation of donor corneal endothelial viability with the vital stains, rose bengal and Evans blue. *Albrecht V. Graefes Arch. Klin. Ophthalmol.*, 204: 153, 1977.
- PELS, E. & SUCHARD, Y. — Organ culture and endothelial evaluation as a preservation method for human corneas. In: BRIGHTBILL, F. S. — *Corneal Surgery*. St. Louis: The C. V. Mosby Co. 1986: p. 94.
- SPERLING, S. — Early morphological changes in organ cultured human corneal endothelium. *Acta Ophthalmologica*, 56: 785-792, 1978.
- STOCKER, F. W.; KING, E. H.; LUCAS, D. O. & GEORGIADIS, N. A. — Clinical test for evaluating donor corneas. *Arch. Ophthalmol.*, 84: 2-7, 1970.