

Estudo da toxicidade corneana de dois perfluorocarbonos líquidos

Corneal toxicity study of two perfluorocarbon liquids

Joaquim M. de Queiroz Jr.
Hamilton Moreira
Peter E. Liggett
Peter J. McDonnell
Serdar A. Özler

RESUMO

Perfluoropoliéter (PFPE) e perfluorooctano (PFOC) foram injetados na câmara anterior direita de coelhos (quatro para cada perfluorocarbono líquido), servindo os olhos contralaterais como controle (injeção de solução salina balanceada). A toxicidade corneana foi avaliada ao final da primeira e segunda semana após a injeção, através da avaliação clínica, microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura do endotélio corneano. No grupo injetado com PFPE encontramos maior reação inflamatória de câmara anterior e neovascularização de córnea, diferença estatisticamente significativa ($p < 0.02$) comparado ao grupo do PFOC e olhos controle. Quanto ao fenômeno de "ova de peixe", o PFOC mostrou-se mais suscetível ($p < 0.03$). Na microscopia óptica e de varredura observamos maior reação inflamatória e perda de células endoteliais nos dois grupos injetados com PFCLs e normal no grupo-controle. Os resultados sugerem que ambos PFCLs estudados apresentam toxicidade corneana após a primeira semana de permanência na câmara anterior.

Palavras-chave: perfluorocarbonos líquidos, córnea, substitutos vítreos, toxicidade.

INTRODUÇÃO

Perfluorocarbonos líquidos são substâncias que recentemente foram introduzidas no contexto da cirurgia vítreo-retiniana⁽¹⁾. São substâncias adjuvantes nos casos complicados de descolamento de retina, tais como roturas gigantes⁽²⁾, proliferação vítreo-retiniana⁽³⁾, traumatismos perfurantes com envolvimento do segmento posterior⁽⁴⁾. A grande maioria destes casos trata-se de pacientes afácicos ou facectomizados durante o ato operatório. Isto possibilita que, inadvertidamente, estes líquidos entrem em contato com a córnea. Vários estudos experimentais têm avaliado sua tolerância dentro da cavidade vítrea, mas seus efeitos em relação ao segmento anterior ainda são poucos conhecidos⁽⁵⁾.

A utilização destes líquidos em humanos tem se restringido a uma ferramenta cirúrgica até o presente momento, sendo, portanto, retirado ao final do ato operatório. Em decorrência das propriedades físicas únicas destes líquidos, opticamente transparentes, densidade maior que a água e biologicamente inertes, o interesse nestas substâncias tem aumentado nos últimos anos em relação a sua utilização não como um substituto vítreo temporário, mas sim como um substituto permanente, sendo, portanto, uma alternativa futura para os óleos de silicone, cuja toxicidade ocular ainda permanece controversa⁽⁶⁻¹¹⁾.

Em estudos experimentais semelhantes ao presente, com a utilização de outros perfluorocarbonos que não o perfluoropoliéter (PFPE) e o perfluorooctano (PFOC), a permanência

Doheny Eye Institute e Departamento de Oftalmologia da Universidade do Sul da Califórnia, Los Angeles, Califórnia, Estados Unidos.

Endereço para correspondência:

Dr. Joaquim M. de Queiroz Jr.
Tv. Mauriti, 3.157 - Belém, Pará, Brasil -
CEP 66240.

dentro do olho tem variado de horas até meses⁽¹²⁻¹⁴⁾. O objetivo deste estudo é a avaliação da toxicidade corneana do PFPE e do PFOC nas primeiras duas semanas após sua introdução dentro da câmara anterior.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo utilizamos oito coelhos pigmentados entre 2 e 4 quilos.

Os animais foram mantidos em dependências inteiramente aprovadas pela Associação Americana de Animais de Laboratório para Ciência (American Association of Laboratory Animal Science) e todos os estudos nos animais foram de acordo com a resolução da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (Association for Research in Vision and Ophthalmology) sobre o uso de animais em pesquisa.

Os substitutos vítreos utilizados neste estudo foram o PFPE de baixa densidade (AflunoxTM 606) e o PFOC de alta pureza (C8F18), ambos fornecidos pela PCR Incorporated (Gainesville, Flórida, Estados Unidos).

Após anestesia geral com injeção intramuscular de ketamina (35mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) os animais foram submetidos a injeção monocular na

câmara anterior de 0,05 ml dos referidos líquidos, através de seringa e agulha de insulina. Divididos em dois grupos, quatro animais foram injetados com PFPE e quatro com PFOC, sempre no olho direito. O olho esquerdo foi utilizado como controle, onde foi realizada injeção de 0,05 ml de solução salina balanceada (BSS). Cuidados foram tomados para que o local da injeção fosse sempre nos quadrantes superiores.

A avaliação clínica foi realizada de acordo com o método de McDonald e Sadduck⁽¹⁵⁾ ao final da primeira e segunda semana. Um único observador sem conhecimento a que grupo o olho examinado pertencia, realizava a quantificação dos parâmetros pesquisados. Documentação fotográfica do olho externo foi também realizada nestes tempos. Os parâmetros observados foram injeção, edema e secreção conjuntival; edema e neovascularização corneana, tamanho do defeito epitelial; reação inflamatória na câmara anterior e envolvimento da íris.

Também investigamos a tendência a dispersão dos perfluorocarbonos líquidos, fenômeno chamado de "ova de peixe", seguindo os seguintes parâmetros: 0 = bolha única; 1 = no máximo 3 bolhas; 2 = várias bolhas de no mínimo 2 mm de diâmetro; 3 = bolhas

menores que 2 mm de diâmetro.

Ao final da segunda semana após a injeção dos líquidos, os animais foram sacrificados com injeção intracardíaca de pentobarbital (100 mg/kg). As córneas foram trepanadas, imediatamente imersas em fixador de Karnovsky e mantidas refrigeradas por 72 horas. Após este período, as córneas foram cortadas ao meio; uma metade processada para microscopia óptica e a outra para microscopia eletrônica de varredura.

A análise estatística dos resultados foi realizada através do método de Wilcoxon.

RESULTADOS

Devido a maior viscosidade do PFPE, uma dificuldade constantemente maior foi observada durante a injeção deste líquido em relação ao PFOC. Ambos os líquidos, à medida que eram injetados na câmara anterior, devido a densidade maior que a do humor aquoso, depositaram-se inferiormente na câmara anterior.

Na avaliação clínica ao final da primeira semana, com relação aos parâmetros observados, nenhuma diferença estatística foi demonstrada entre os dois grupos injetados com PFCLs e olhos controle.



Fig. 1 – Fotografia externa de um olho injetado com PFPE no 14º dia após a injeção. Nota-se neovascularização corneana, intensa reação inflamatória na câmara anterior e envolvimento da íris.



Fig. 2 – Fotografia externa de um olho com PFOC no 14º dia após a injeção. Nota-se córnea transparente e intenso fenômeno de "ova de peixe" na câmara anterior.

Ao final da segunda semana, entretanto (Fig. 1), neovascularização corneana, reação inflamatória na câmara anterior e envolvimento da íris foi maior no grupo de olhos injetados com PFPE, demonstrando diferença estatisticamente significativa em relação ao PFOC e BSS, para todos estes parâmetros ($p < 0,02$). Edema corneano e injeção conjuntival, apesar de não terem manifestado diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos injetados com PFCLs e olhos controle, foram mais intensos no grupo de olhos injetados com PFPE. Edema e secreção conjuntival não foram observados em nenhum dos olhos injetados com PFCLs, sendo os únicos parâmetros sem diferença com o grupo-controle. Quanto ao fenômeno de "ova de peixe" (Fig. 2), foi mais intenso nos olhos injetados com PFOC ($p < 0,03$ vs PFPE).

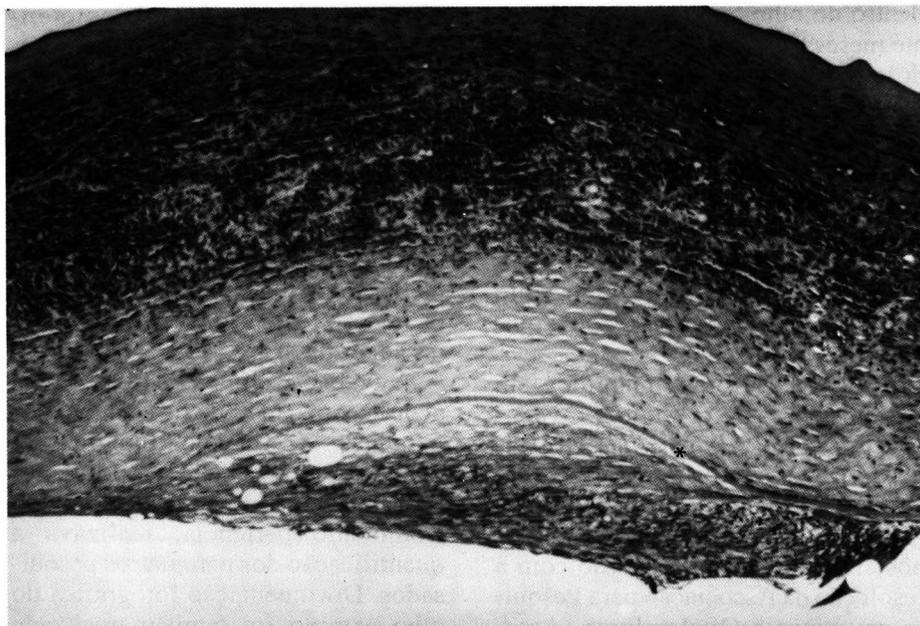


Fig. 3 – Fotomicrografia da córnea de um olho injetado com PFPE onde se nota espessamento e neovascularização estromal. Observa-se intensa reação fibrinóide com "células espumosas" depositadas sobre a membrana de Descemet(*). (Magnificação original x25,2).

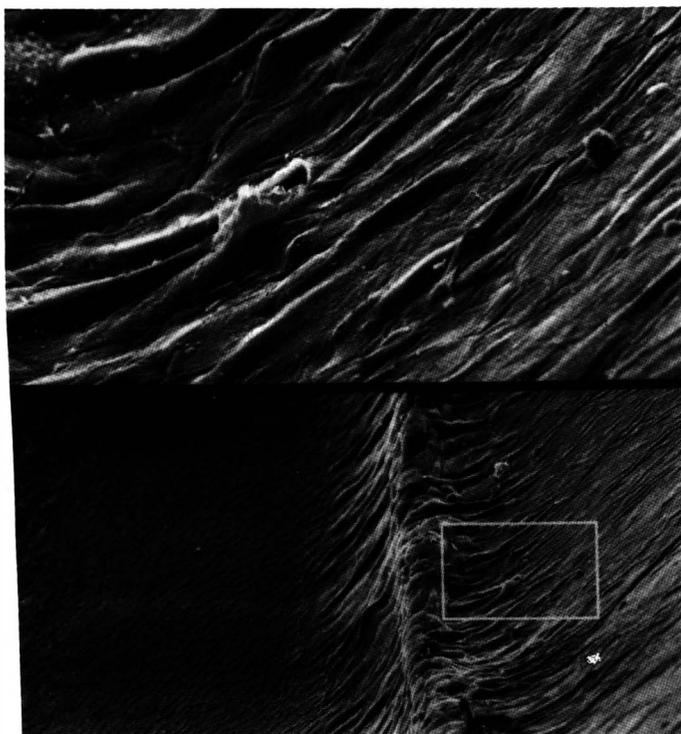


Fig. 4 – Eletromicrografias de varredura do endotélio corneano de um olho injetado com PFPE (A) e outro com PFOC (B). Observa-se barreira inflamatória nítida separando a zona em contato com o PFPE (4A, metade inferior, x154,5) do endotélio normal, ao contrário da córnea em contato com o PFOC, onde se observa tênue limite entre as duas zonas (4B, metade inferior, x72,5). O endotélio corneano está totalmente (4A, metade superior, x772,5) ou parcialmente (4B, metade superior, x725) ausente nas áreas em contato com os PFCLs.

À microscopia óptica observou-se perda de células endoteliais na área em contato da(s) bolha(s) com a córnea, sendo total no grupo injetado com PFPE e parcial no grupo injetado com PFOC. Em um olho injetado com perfluoropoliéter notou-se espessamento corneano devido a intensa reação inflamatória, neovascularização e edema intra-estromal (Fig. 3). Neste mesmo olho era evidente intensa reação fibrinóide e macrófagos com citoplasma vacuolizado, “células espumosas”, separando a área normal da patológica.

A microscopia eletrônica de varredura, nítida alteração do padrão mosaico normal das células endoteliais pode ser observada na região inferior da córnea, que estava em contato com os PFCLs. Em todos os olhos do grupo injetado com PFPE (Fig. 4A), uma barreira facilmente observada entre o endotélio normal (superior, em contato com o humor aquoso) e o endotélio afetado (inferior, em contato com o PFPE). Este limite entre as duas regiões não era nítido e de difícil demarcação nos olhos injetados com PFOC (Fig. 4B).

Os olhos injetados com BSS não revelaram nenhuma alteração patológica tanto à microscopia óptica quanto à de varredura.

DISCUSSÃO

Atualmente o único substituto vítreo com possibilidade de tamponamento prolongado em cirurgia vítreo-retiniana é o óleo de silicone⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Os perfluorocarbonos líquidos têm sido investigados com o mesmo propósito, porém os resultados iniciais têm sido desanimadores^(12,17).

Por serem mais densos que a água, Healon® e óleo de silicone⁽²⁾, os PFCLs propiciarão uma maior facilidade para o tamponamento das roturas e buracos retinianos situados nos quadrantes inferiores, especialmente no pós-operatório, quando da deambulação do paciente. Configura-se as-

sim uma grande vantagem em relação ao óleo de silicone.

Em olhos descompartimentalizados, sem barreira entre segmento posterior e anterior, a migração dos substitutos vítreos para a câmara anterior é um risco iminente. Chang e cols.⁽²⁾ relataram um paciente onde foram encontradas bolhas residuais de perfluorotributilamino no seio camerular após vitrectomia para rotura gigante da retina. Embora clinicamente estas bolhas parecem ser bem toleradas, a importância de estudar-se a toxicidade corneana aos perfluorocarbonos é óbvia.

Uma característica marcante em nosso estudo, foi a maior tendência ao fenômeno de “ova de peixe” com o uso do PFOC. Esta tendência também foi observada por outros autores quando outro perfluorocarbono com semelhante densidade foi estudado^(13,14).

A diferença entre os dois grupos em relação a avaliação clínica do edema corneano não pode ser comprovada estatisticamente. Entretanto, ao exame com microscopia óptica e eletrônica de varredura demonstramos uma maior alteração do endotélio corneano no grupo do PFPE. Talvez este fato tenha relação com o fenômeno de “ova de peixe”, onde o contato entre o líquido e o endotélio corneano tenha sido maior no grupo do PFPE pela sua menor dispersão. A formação de várias bolhas no grupo do PFOC possibilita, no nosso entender, a circulação do humor aquoso entre as mesmas, retardando a alteração endotelial.

Em nosso modelo animal experimental, a discrepância entre os dois grupos estudados quanto a reação inflamatória foi marcante. Em alguns olhos notamos inclusive sinéquias irido-cristalinianas e deposição de fibrina sobre a bolha do PFPE na câmara anterior.

Concluímos que ambos PFCLs usados neste estudo são tóxicos para o endotélio corneano comparando-se com o BSS. Evidenciamos maiores alterações no grupo injetado com

PFPE em relação ao PFOC, entretanto, sugerimos evitar o contato de ambas as substâncias com o endotélio, mesmo que somente no período peroperatório.

SUMMARY

Corneal toxicity of perfluoropolyether and perfluorooctane was evaluated by uniocular injection of each of these substances into the anterior chamber of eight rabbits. Corneal clinical appearance was studied at one and two weeks following injection, after which the animals were sacrificed and the corneas processed for light and for scanning electron microscopy. Animals injected with perfluoropolyether showed more intense inflammatory reaction and corneal vascularization ($P < 0.02$) than did those receiving perfluorooctane. However, the perfluorooctane group showed more of the “fish-egging” phenomenon ($P < 0.03$). Light and scanning electron microscopy disclosed endothelium cell loss in both perfluorocarbon liquid groups. These results suggest that corneal toxicity of these two perfluorocarbon liquids is a major problem after the first week in the anterior chamber.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Argyrios Ziogas pela orientação na análise estatística dos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHANG S. - Low viscosity liquid fluorochemicals in vitreous surgery. *Am. J. Ophthalmol.* 1987;103: 38-43.
2. CHANG S., LINCOFF H., ZIMMERMAN N.J., FUCHUS W. - Giant retinal tears: surgical techniques and results using perfluorocarbon liquids. *Arch. Ophthalmol.* 1989;107:761-766.
3. CHANG S., OZMERT E., ZIMMERMAN N.J. - Intraoperative perfluorocarbon liquids in the management of proliferative vitreoretinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* 1988; 106: 668-674.

4. CHANG S., REPPUCCI V., ZIMMERMAN N.J., HEINEMANN M.H., COLEMAN D.J. - Perfluorocarbon liquids in the management of traumatic retinal detachments. *Ophthalmology* 1989;96: 785-792.
5. WILKINSON A.W. FARBER M.E., ZIMMERMAN N.J., - Anterior chamber toxicity for perflurotri-n-propylamine: A vitreous substitute. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1985,25(suppl.): 34.
6. STONE W. JR. - Alloplasty in surgery of the eye. *N. Engl. J. Med.* 1958; 258: 486-490.
7. ARMALY M.F. - Ocular tolerance to silicones. I. Replacement of aqueous and vitreous by silicone fluids. *Arch. Ophthalmol.* 1962; 68: 390-395.
8. LABELLE P., OKUN E. - Ocular tolerance to liquid silicone: an experimental study. *Can. J. Ophthalmol.* 1972, 7: 199-204.
9. LEE P., DONOVAN R.H., MUKAIN. - Intravenous injection of silicone: an experimental study. I. Clinical picture and histology of the eye. *Ann. Ophthalmol.* 1969; 1(2): 15-25.
10. MUKAI N., LEE P., SCHEPENS C.L. - Intravenous injection of silicone: an experimental study. II. Histochemistry and electron microscopy. *Ann. Ophthalmol.* 1972; 4: 273-287.
11. MUKAI N., LEE P., OGURI M., SCHEPENS C.L. - A long-term evaluation of silicone retinopathy in monkeys. *Can. J. Ophthalmol.* 1975; 10: 391-402.
12. MIYAMOTO K., REFOJO M.F., TOLENTINO F.I., FOURNIER G.A., ALBERT D.A. - Perfluoroether liquid as a long-term vitreous substitute: an experimental study. *Retina* 1984, 4: 264-268.
13. NABIH ., PEYMAN G.A., CLARK L.C., Jr., HOFFMAN R.E., MICELI M., ABOUT-STEIT M., TAWAKOL M., LIU K-R. - Experimental evaluation of perfluorophenathrene as a high specific gravity vitreous substitute: A preliminary report. *Ophthalmic Surg.* 1989, 20: 286-293.
14. CHANG S., ZIMMERMAN N.J., IWAMOTO T., ORTIZ R., FARIS D. - Experimental vitreous replacement with perfluorotributylamine. *Am. J. Ophthalmol.* 1987, 103: 29-37.
15. MCDONALD T.O., SHADDUCK J.A. - Eye irritation. In: Marzulli, F.N. & Maibach, H.I. (ed.): *Advances in Modern Toxicology*, vol. 4, pp. 139-191, 1979.
16. OBER R.R., BLANKS J.C., OGDENT.E., PICKFORD M., MINCKLER D.S., RYAN S.J. - Experimental retinal tolerance to liquid silicone. *Retina* 1983; 3: 77-85.
17. MIYAMOTO K., REFOJO M.F., TOLENTINO F.I., FOURNIER G.A., ALBERT D.M. - Fluorinated oils as experimental vitreous substitutes. *Arch. Ophthalmol.* 1986; 104: 1053-1056.
18. CHAN C., OKUNE. - The question of ocular tolerance to intravitreal liquid silicone. A long-term analysis. *Ophthalmology* 1986; 93: 651-660.

ERRATA

No artigo "Estudo da toxicidade corneana de dois perfluorocarbonos líquidos", publicado nos *ABO* 55(6):244-248, 1992, "a figura nº 2 foi publicada invertida. As bolhas de perfluorocarbono líquido são mais densas que o humor aquoso, portanto deveriam estar ocupando a porção inferior da câmara anterior, jamais superior, como foi publicado".