

PAULO ESTACIA

AÇÃO DO PERFLUOROCTANO EM CULTURA DE
CÉLULAS VERO

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a)
Paulo Estacia
e aprovada pela Comissão Julgadora.
03/09/99

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção do Título de Mestre
em Biologia Celular e
Estrutural na área de Biologia
Celular.

Orientador: Profa. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada

1999

9919215



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	22810
V. Ex.	39273
TCARBO DO	229/99
PREC. C	D X
PREÇO	22811,00
DATA	28/10/99
N.º QPD	

CM-00136602-3

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Estacia, Paulo

Es81a

Ação de perfluorooctano em cultura de células vero/
Paulo Estacia. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999.
31f.:ilus.

Orientadora: Maria Lucia Furlan Wada
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Cultura de células 2. Citotoxicidade. 3. Oftalmologia. I. Wada,
Maria Lucia Furlan. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto.
de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 03/09/1999

Banca Examinadora

Titulares:

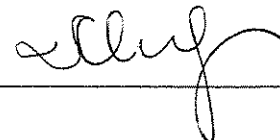
Profa. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada (Orientadora)



Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek



Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho



Suplentes:

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro



Dedicatória

Para Cida, Carolina e Carime,
esposa e filhas,
fontes de apoio e estímulo
para a realização de novos projetos.

Agradecimentos

À Prof^a Dra. Maria Lúcia F. Wada,
orientadora deste trabalho, pela sua disponibilidade e atenção.

Ao Prof. Arnaldo dos Santos Jr.,
pela inestimável colaboração para a realização desta tese.

À CAPES, pelo projeto de
Mestrado Interinstitucional UNICAMP/UPF.

RESUMO

Cultura de células Vero foram usadas como modelo para avaliar a ação de um perfluorocarbono líquido (PFCL) comumente usado em oftalmologia, nas cirurgias vitreoretinianas. O Perfluorooctano (PFOC) é utilizado neste procedimento cirúrgico por ter, entre outras características, alto peso específico, facilitando portanto o reposicionamento da retina.

Foi avaliado o comprometimento de tapetes de células Vero submetidos à ação do PFOC e o efeito ocasionado a outros tapetes da mesma cultura celular sob pressão exercida por lamínulas de vidro com um peso e área equivalentes ao peso do PFOC. As alterações celulares foram comparadas após 6, 12 e 24h de contato do PFOC e do peso das lamínulas com os tapetes celulares.

As células foram avaliadas quanto às alterações morfológicas, com coloração por Cresil Violeta (CV); citoquimicamente, através de coloração com o Azul de Toluidina (AT) pH 4,0 e imunocitoquimicamente, com o uso de anticorpos anti-actina e anti-vimentina.

Os resultados mostraram comprometimento das células sob o efeito do peso, com retração citoplasmática e formação de prolongamentos celulares ligando as células entre si. Foi observada também uma diminuição do número de células presentes no tapete. Sob a ação do PFOC o comprometimento celular foi maior, tendo as células apresentado degeneração mais marcante e diminuição do número de células mais acentuado. Estes resultados eram mais evidentes à medida que aumentava o tempo de contato das células com o PFOC sendo que após 24h células integras eram observadas apenas na região periférica da gota. Nas áreas do tapete celular que não estavam sob o efeito do peso das lamínulas ou do PFOC não foi observada nenhuma modificação nas células.

As alterações celulares decorrentes do efeito físico ocasionado pela alta gravidade específica do PFOC eram esperadas e foram encontradas também nas células que estavam sob o efeito de um peso proporcional inerte. O comprometimento mais acentuado e o surgimento de alterações mais precoces nas células sob o efeito do PFOC faz acreditar que ele tenha uma ação tóxica sobre as células e que não atue única e exclusivamente pelo peso.

Considerando o comprometimento celular que encontramos em células submetidas ao efeito físico, não tóxico, do peso produzido por lamínulas, o uso de substâncias de alto peso específico para manter a retina posicionada leva a um dano celular, o que deve ser considerado quando utilizadas por longos períodos de tempo. Além disso, as alterações encontradas de comprometimento celular, que se acentuam com o tempo, não recomendam o uso do PFOC como substituto vítreo de longo prazo e mostram a importância da sua remoção após o ato cirúrgico.

ABSTRACT

Culture of Vero cells was used as a model to evaluate the action of one of the liquid perfluorocarbons (PFCL) most commonly used in ophthalmology in vitreo retinal surgeries, The Perfluorooctane (PFOC) has among other characteristics a high specific weight, which consequently facilitates the replacement of the retina.

Analyses were made of the damage incurred to monolayers of Vero cells that were submitted to the action of PFOC, or the effect on the same confluent cells weighted down by a corresponding layer of glass coverslips that were equivalent to the PFOC weight and area. The cellular alterations were compared after 6, 12 and 24 hours of contact with the PFOC or with the coverslips' weight on the cellular monolayer.

The cells were evaluated with three methods: cresyl violet (CV) staining for morphological alterations; cytochemically, through staining with toluidine blue (TB) pH 4.0; and immunocytochemically, with the use of anti-actin and anti-vimentin antibodies.

The results show damage to the cells, under the effect of weight, with cytoplasmic retraction and formation of the cellular prolongations that bind the cells together. Also, a reduction in number of cells in the monolayer was observed but cells were found under the weight up to 24 hs of incubation. Cellular damage was greater in contact with PFOC, as the cells presented a more marked degeneration and the reduction of their number was more accentuated, with the alterations in all cells in contact with PFOC after 24 hs. These results were more evident as the time of cell contact with PFOC or the coverslips' weight increased. In the areas of the cellular monolayer that were not submitted to these factors no modification was observed.

Cellular alterations resulting from the physical effect caused by the high specific gravity of the PFOC were expected and were also found in cells under the effect of a proportional inert weight. The greater damage and the precocious alterations in the cells under the effect of the PFOC suggest a toxic interaction with the cells and not a reaction exclusively due to weight.

Considering the damage that we found in cells submitted to the physical non-toxic effect of the weight of coverslips' weight, the use of substances with a high specific weight to stabilize the

retina over long periods of time seems to be limited. Moreover, the cellular damage verified in this study, which increased with time does not suggest the use of the PFOC as a vitreous substitute over long periods of time and shows the importance of its removal after the surgical procedure.

SUMÁRIO

Resumo.....	v
Abstract.....	vii
1- INTRODUÇÃO.....	01
2- OBJETIVOS.....	03
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	04
3.1- Manutenção das células em cultura.....	04
3.2- Perfluoroctano.....	04
3.3- Teste de Citotoxicidade.....	04
3.3.1- Obtenção dos extratos.....	04
3.3.2- Análise em cultura de células.....	05
3.4- Teste para verificação da ação mecânica do Perfluoroctano.....	05
3.4.1- Análise Morfológica.....	06
3.4.2- Análise Citoquímica.....	06
3.4.3- Análise Imunocitoquímica.....	06
4- RESULTADOS.....	08
4.1- Teste de Citotoxicidade.....	08
4.2- Análise Morfológica com Cresil Violeta.....	08
4.3- Análise Citoquímica com Azul de Toluidina pH 4,0.....	10
4.4- Imunocitoquímica.....	11
4.4.1- Anticorpo anti-actina.....	11
4.4.2- Anticorpo anti-vimentina.....	12
5- DISCUSSÃO.....	17
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

1 - INTRODUÇÃO

Perfluorcarbonos líquidos são compostos sintéticos, com ligações fluor-carbono e com propriedades físicas similares entre si. Entre os mais usados em oftalmologia temos o Perfluoroctano, o Perfluorodecalin e a Perfluorotributilamina, todos com grande capacidade de transportar e liberar tanto oxigênio (O_2) como gás carbônico (CO_2). Os PFCLs (perfluorocarbonos líquidos) são substâncias que, por terem uma gravidade específica maior que a da água (quase o dobro), por serem imiscíveis com a água, com o silicone ou com o sangue, permitem uma manipulação relativamente atraumática do tecido retiniano (Peyman et al. 1995). O seu uso facilita a cirurgia numa ampla variedade de condições, reposicionando e moldando a retina para sua posição original com maior facilidade e segurança, com menor dano aos tecidos intraoculares (Glaser et al, 1991), como nos casos complicados de descolamento de retina, vitreoretinopatia diabética e quando lentes intra-oculares ou o próprio cristalino são deslocados para o vítreo.

Por serem opticamente transparentes, e apresentarem alta gravidade específica, permitem um aplainamento da retina com uma força maior que volumes equivalentes de hialuronato de sódio ou óleo de silicone. Por apresentarem baixa viscosidade sua colocação e remoção pode ser efetuada com cânulas de microcirurgia, facilitando a manipulação dos tecidos e sua própria injeção e remoção (Chang et al., 1989). Em decorrência destas características físico-químicas, tem aumentado nos últimos anos o interesse por estas substâncias com relação a sua utilização como instrumento intra-operatório, sendo que seu uso, inicialmente no manuseio de rupturas gigantes de retina, foi introduzido a partir de 1989 (Mathis et al., 1992).

Existe um interesse cada vez maior nestas substâncias em relação a sua utilização não apenas como substituto vítreo temporário, mas sim como um substituto permanente por ser mais eficiente em manter a retina colada, como demonstrado por Sparrow et al (1992) em descolamentos de retina induzidos experimentalmente, já que tem uma força de tamponamento maior. O óleo de silicone é o substituto vítreo usado atualmente por

períodos de tempo mais longos (um ano ou mais, ou mesmo permanentemente) mas com menor eficiência de tamponamento pela sua menor densidade e também com problemas, como redescolamentos da retina e complicações tardias frequentes como catarata, glaucoma e alterações corneanas (Chan & Okun., 1986).

Os dados da literatura são controversos quanto à toxicidade dos perfluorocarbonos (PFC). Os perfluorocarbonos líquidos (PFCLs) puros são considerados geralmente inertes e vários têm sido usados como substitutos do sangue por serem bons carreadores de oxigênio e dióxido de carbono (Geyer R. P., 1973, 1982, apud Peyman et al 1995). Em culturas de células, a adição de 10% de PFC nas emulsões de meios de cultura em bioreatores permite um aumento de cerca de 60% na concentração de células vivas pelo aumento do suprimento de oxigênio às células e melhor suspensão destas no meio (Lu-Kwang et al, 1992). A toxicidade nos PFCS seria causada por impurezas, como compostos com ligações nitrogênio, compostos contendo hidrogênio e ligações insaturadas de carbono (Peyman et al., 1995). Alguns autores descrevem em seus experimentos que a retenção no vítreo de um pequeno volume de perfluorocarbono líquido depois de seu uso intraoperatório não induz resposta tóxica (Green et. al ,1993). Experimentos baseados em estudos histopatológicos em animais, demonstram que pequenas gotículas residuais intravítreas (0,1 ml) são bem toleradas por até 6 meses (Chang et al., 1991).

Outros autores afirmam que os perfluorocarbonos líquidos deixados nos olhos dos pacientes após a cirurgia para atuarem como agentes tamponantes podem causar reações inflamatórias e danos celulares, como destruição da arquitetura normal da retina com sua desorganização, compressão e com redução no número de células (Chang et al., 1991). Entretanto não ficou claro se esses achados deveriam ser atribuídos a danos tóxicos ou mecânicos, observando-se um efeito progressivo proporcional ao tempo de contato desta substância com a retina (Velikay et al., 1993). Peyman et al. (1995) em revisão da literatura sobre o uso de PFCLs acham que esta “toxicidade” seria decorrente mais de um efeito físico que de uma toxicidade química. Green et al. (1993) em experimentos com coelhos observaram que a retenção de até 25% do volume da cavidade vítrea com Perfluorooctano (PFOC), não evidenciava toxicidade em períodos de observação de até 7

semanas. Eckardt et al. (1991) avaliando de maneira experimental a tolerância intraocular para dois PFCLs, o Perfluoroctano e o Perfluoropolieter, concluíram que os achados histológicos encontrados na retina inferior, que foi a parte do tapete retiniano que esteve em contato com os dois produtos, são de natureza tóxica. Também outros autores, em estudos experimentais, avaliando o uso de outros PFCLs como substitutos vítreos de longo prazo, concluíram que mesmo estando altamente purificados, eles são tóxicos à retina. (Velikay et al., 1993; Chang et al, 1987).

O uso de biomateriais em sistemas biológicos tem sido extensivamente conduzido em estudos *in vivo*. Este sistema limita e impõe obstáculos à análise de diferentes parâmetros. O desenvolvimento das técnicas de cultura de células para avaliar a bioatividade e a citotoxicidade de compostos com potencial para uso médico tem minorado esse problema.

2 - OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é avaliar a resposta celular perante um perfluorocarbono líquido, o perfluoroctano (PFOC) usado com frequência na cirurgia de vítreo-retina, com diferentes tempos de ação, utilizando cultura de células Vero como modelo.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- *Manutenção das células em cultura*

Neste trabalho foram utilizadas células Vero, uma linhagem celular fibroblástica estabelecida a partir de células renais do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Estas células são provenientes do Instituto Adolfo Lutz, SP e foram mantidas em meio HAM -F10 (Sigma) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell) a 37° C. Houve trocas do meio sempre que ocorreu acidificação do mesmo, com repiques periódicos efetuados sempre que ocorresse a confluência do tapete celular.

Esta linhagem celular é recomendada para estudos de citotoxicidade com biomateriais por normatizações internacionais (Kirkpatrick, 1992).

3.2 - *Perfluorooctano (PFOC):*

O Perfluorooctano (PFOC) utilizado neste trabalho apresenta as seguintes características químicas: fórmula empírica C_8F_{18} , peso molecular 438, gravidade específica 1.76 g/ml, viscosidade 0,8 (centistoke, a 25°C.), índice de refração 1,27 e tensão superficial de 14(dyne/cm). Este produto foi adquirido de Ophthalmos Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos Ltda, em frasco ampolas de 5ml, estéreis e com índice de pureza para uso médico (quase 100%). Quando utilizado no meio de cultivo era adicionado lentamente, para evitar a formação de pequenas bolhas, fenômeno chamado de “ovas de peixe”.

3.3 - *Teste de Citotoxicidade*

3.3.1- Obtenção dos extratos

O teste para verificação da citotoxicidade do PFOC foi efetuado de acordo com as normas internacionais ISO 10993 (1992) e Kirkpatrick (1992).

Resumidamente o PFOC foi adicionado ao meio de cultura completo (HAM -F10 com 10% de SFB) na proporção de 1 g de PFOC para 10 ml de meio de cultura e deixado extrair a 37° C por 48 horas. Foram utilizados como controle positivo, que causa efeito

citotóxico, um extrato de silicone (Rhodiastic), e como controle negativo, que não tem efeito citotóxico, um extrato de polipropileno, material utilizado rotineiramente em recipientes para cultura de células. Todos os extratos foram obtidos pelo método descrito anteriormente.

3.3.2 - Análise em cultura de células

Células Vero, na proporção de 1×10^5 células/ml em meio de cultura HAM -F10 com 10% de SFB, foram inoculadas em placas para cultura de células com 6 poços (Corning). As células foram incubadas a 37°C durante 4 h para que o processo de adesão ocorresse. A seguir este meio foi retirado e 3 ml dos extratos do PFOC, do controle positivo e do controle negativo foram adicionados às placas. O experimento foi efetuado em triplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, fixadas em metanol/ácido acético 3:1 (volume/volume), coradas com Cresil Violeta, lavadas, secas ao ar e observadas em microscopia de luz.

3.4 - Teste para verificação da ação mecânica do PFOC

Um ml de uma suspensão de células vero em meio HAM -F10 com 10% de SFB contendo 10^5 células/ml foi inoculada em cada poço de uma placa de cultura de células com 24 poços. As placas foram incubadas a 37°C por 12 horas.

Após este período de incubação 0,4 ml de PFOC foi adicionado sobre o tapete celular. Como controle não tóxico do experimento foram utilizadas laminulas de vidro com aproximadamente 700mg, fazendo a compressão mecânica proporcional ao peso e área dos 0,4ml de perfluorotano. Como controle negativo utilizamos as células cultivadas em meio de cultura na ausência de qualquer outro tratamento.

Foram usadas 6 placas de 24 poços, onde cada placa apresentava compartimentos usados para o controle, para o PFOC, para o peso das laminulas (controle positivo) e para o controle inicial do experimento. As amostras foram colhidas fixadas e coradas, nos tempos de seis, doze e vinte e quatro horas após a adição de PFOC e das laminulas. As células de todas as amostras foram analisadas sob aspectos morfológicos, citoquímicos e imunocitoquímico. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

3.4.1 - Análise morfológica

Amostras foram fixadas com paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 e coradas com cresil violeta por 20 minutos, lavadas em água, secas ao ar, diafanizadas em xilol (MERCK) por 10 minutos e montadas com Entelan (MERCK).

3.4.2. - Análise citoquímica

O material foi fixado em etanol/ácido acético 3:1 (v/v). A análise foi realizada através da coloração com Azul de Toluidina (0,025 % em tampão MacIlvaine pH 4,0). O material foi corado por 15 minutos, lavado por passagem rápida em água, deixado secar ao ar, diafanizado por imersão em xilol por 10 minutos e a seguir montado com Entelan.

3.4.3 -Análise Imunocitoquímica

A análise imunocitoquímica para detecção de actina e vimentina foi efetuada em experimento realizado como descrito no item 3.4, sendo que as amostras foram colhidas após 12 h de contato com o PFOC ou com o peso equivalente em lâminulas.

Após 12 h de incubação o meio de cultivo foi retirado e as placas foram lavadas com salina 0,9% em tampão fosfato (PBS) a 37°C. O material foi fixado em solução de Karnovsky (paraformaldeído 4% / glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1M ,pH 7,4) com Triton X100 a 0,2 % durante 30 minutos, lavadas com PBS a 37°C e incubadas com PBS mais albumina sérica bovina - (BSA, Sigma) a 1% durante uma hora a 4°C. O material foi tratado com anticorpo monoclonal primário anti-actina (Sigma, clone AL - 40, prod. número A-4.700, Lote 0744826) diluído 1:200 ou com anticorpo anti-vimentina (Sigma, clone Vq, prod. Número V-6630), diluído 1:40 em PBS contendo BSA a 1% durante 18 h a 4°C em câmara úmida. Após lavagem com PBS mais BSA a 1% o material foi incubado por uma hora com anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado com FITC (Sigma) diluído 1:128 em PBS mais BSA a 1%, lavado com PBS mais BSA e montado em lâmina com Vectashield e vedação com esmalte. A observação foi efetuada

em microscópio invertido Olympus IX-50 usando filtros para fluorescência e fotografado com filme Kodak Ektapress Multi Speed.

4 - RESULTADOS

4.1 - Teste de citotoxicidade

A morfologia das células submetidas ao extrato de polipropileno (controle negativo) e do extrato de PFOC foi idêntica. As células apresentaram crescimento celular fechando o tapete, com muitas figuras de células em divisão. As células eram poligonais, com núcleo grande e com cromatina frouxa de aspecto homogêneo, nucléolo bem evidente, semelhante ao observado na Figura 1a.

O tapete celular submetido ao extrato de silicone descolou, e as poucas células restantes apresentavam sinais de degeneração como retração e vacuolização do citoplasma, picnose e fragmentação nuclear.

Este experimento demonstra que o PFOC não libera nenhuma substância tóxica para o meio.

4.2 - Análise morfológica com Cresil Violeta (CV)

-Com 12 horas da incubação (controle inicial).

As células Vero formavam um tapete celular parcialmente confluyente, homogêneo, com células de formato alongado, estreladas e a presença de muitas figuras de células em divisão, que é um aspecto característico de tapete celular não confluyente (*Figura 1a*).

As células apresentavam vacúolos delicados, não corados com o CV e com 1 ou 2 nucléolos bem evidentes (*Figura 1b*).

-Com 6 horas após a colocação do peso e do PFOC

-Controle: Predominava tapete celular confluyente, com células mais poligonais e mais regulares na sua morfologia. As células apresentavam poucos vacúolos citoplasmáticos, núcleo e citoplasma com aspecto homogêneo e nucléolos bem evidentes. Presença de células em divisão nas regiões do tapete celular que não atingiram a confluência (*Figura 1c*).

-Peso: As células que estavam sob efeito do peso das laminulas sofreram retração citoplasmática formando prolongamentos largos e regulares (*Figura 1d*). Havia um limite nítido entre as células do tapete normais e as células que estavam sob efeito do peso das laminulas.

-PFOC: Na parte do tapete celular que estava sob o PFOC observou-se alteração da morfologia das células. As células apresentavam retração do seu citoplasma, ficando este mais concentrado ao redor do núcleo, com a formação de finos prolongamentos citoplasmáticos os quais ligavam as células entre si formando um tapete celular com “aspecto de rede”. O nucléolo se manteve visível (*Figura 1e*). Não eram observadas figuras de células em divisão, o que ocorreu na área do tapete que não estava sob o efeito do PFOC. Nas regiões da borda da gota de PFOC que denominaremos de zona de transição, as células apresentavam vacuolização mais grosseira do citoplasma e núcleo com tamanho reduzido e mais compacto.

-Com 12 horas após a colocação do peso e do PFOC

-Controle: O tapete celular era confluyente e as células apresentavam aspecto mais poligonal. Este padrão morfológico era semelhante ao observado com 6h (*Figura 1f*).

-Peso: Observou-se pequena redução do número de células e o padrão morfológico era semelhante ao descrito anteriormente com 6hs após a colocação do peso (*Figura 1g*).

-PFOC: Ocorreu uma diminuição acentuada do número de células, sendo que as que persistiam, estavam com o mesmo aspecto das células submetidas ao PFOC por 6 horas. Um número maior de células era encontrado na periferia da gota. (*Figura 1h*).

-Com 24 horas após a colocação do peso e do PFOC

-Controle: O tapete celular era confluyente, com células poligonais (*Figura 1i*)

-Peso: As células apresentavam retração citoplasmática mais acentuada mas persistia os prolongamentos celulares que uniam as células. O citoplasma continham vacúolos, e os núcleos de algumas células estavam menores e mais compactos (*Figura 1j*).

-PFOC: Na região que estava sob o efeito da gota de PFOC existiam apenas restos celulares. Algumas células inteiras foram observadas na região periférica da gota. O aspecto morfológico destas células era semelhante ao observado com 12h de cultivo. As células da região de transição apresentavam formato mais esférico, com muitos vacúolos citoplasmáticos e núcleo picnótico (*Figura 1k*).

4.3 - Análise citoquímica com azul de toluidina pH 4,0.

-Com 12 horas da incubação (Controle inicial)

Observou-se no tapete parcialmente confluyente, células que apresentavam vacúolos pequenos não corados, núcleos corados em azul claro (basófilo) e nucléolos arroxeados (metacromáticos), (*Figuras 2a e b*).

-Com 6 horas após a colocação do peso e do PFOC

-Controle: Observou-se núcleo basófilo, com coloração homogênea. A cromatina estava com aspecto homogêneo e o citoplasma e o nucléolo estavam corados metacromaticamente (*Figura 2c*).

-Peso: As células sob o peso das laminulas apresentavam o citoplasma e o núcleo mais basófilos que o controle, estando o núcleo com aspecto homogêneo sem granulações. O nucléolo corou-se metacromático(*Figura 2-d*).

-PFOC: O núcleo celular apresentava granulações de tamanho variado e metacromáticas, perdendo portanto o aspecto homogêneo. O nucléolo ainda era evidenciado mas já apareciam células com sinais de degeneração com fragmentação nuclear e citoplasmática (*Figura 2e*).

-Com 12 horas após a colocação do peso e do PFOC

-Controle: As células mantinham o mesmo aspecto descrito para 6 horas após a colocação do peso e do PFOC (*Figura 2f*).

-Peso: A maioria das células estava com núcleo basófilo homogêneo, mas já apareciam células com núcleo apresentando granulação fina. O nucléolo continuava evidente (*Figura 2g*).

-PFOC: Na região que estava sob o PFOC quase todas as células desapareceram e nas que sobraram observamos degeneração celular, com células apresentando fragmentação nuclear e núcleos com granulações metacromáticas (*Figura 2h*).

Na área de transição, havia células com alterações degenerativas no meio de células normais

-Com 24 horas após a colocação do peso e do PFOC

-Controle: O tapete celular estava bem fechado, com o mesmo aspecto descrito anteriormente (*Figura 2i*).

-Peso: As células presentes na área de pressão apresentavam núcleo e citoplasma basófilos e o nucléolo era menos evidente. Algumas células apresentavam sinais de degeneração (*Figura 2-j*). Havia uma delimitação nítida entre estas células e as células normais que não estavam sob a ação do peso das laminulas.

-PFOC: Na região central, que estava sob o efeito da gota, permaneceram apenas restos de células (*Figura 2k*). Observou-se ampliação da zona de transição sendo que um maior número de células apresentavam o núcleo com granulações metacromáticas.

4.4 - IMUNOCITOQUÍMICA

4.4.1 - Anticorpo anti-actina.

-Com 12 horas de incubação: (Figura 3).

Controle: Feixes de actina, na forma de fibras de estresse foram observadas. Estas fibras estavam distribuídas ao redor do núcleo (*Figura 3a*), ou mais concentradas na periferia da célula (*Figura. 3b*).

Peso: Com a contração das células as fibras de actina perderam a organização observada no controle. Feixes de actina ainda eram observados nas regiões dos prolongamentos celulares (*Figuras 3c e d*).

PFOC: A reação para actina foi observada de maneira difusa nos restos celulares existentes na região que estava sob o efeito do PFOC (*Figuras 3e e f*).

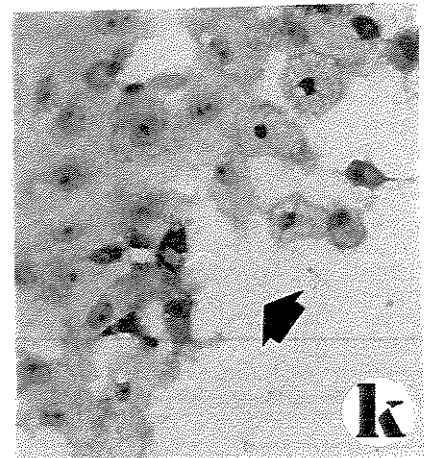
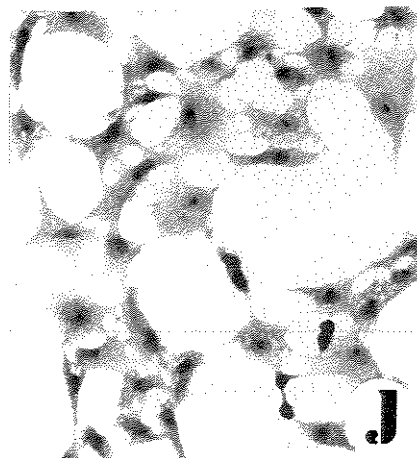
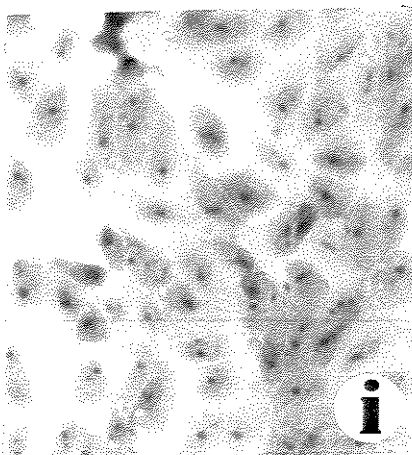
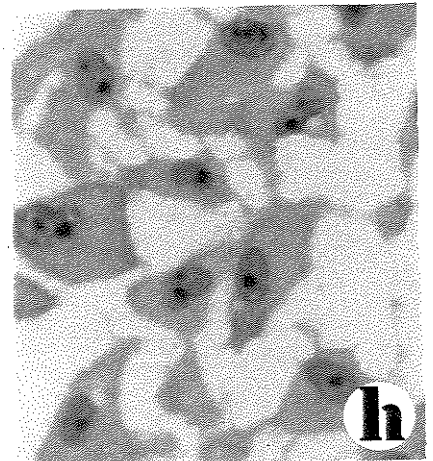
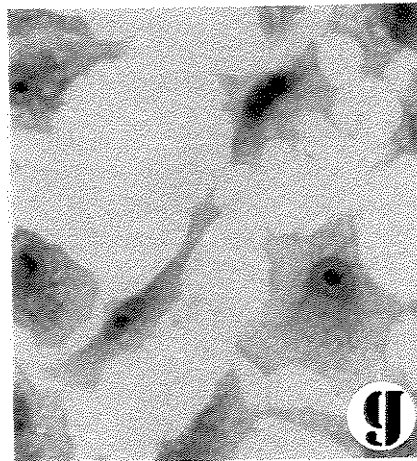
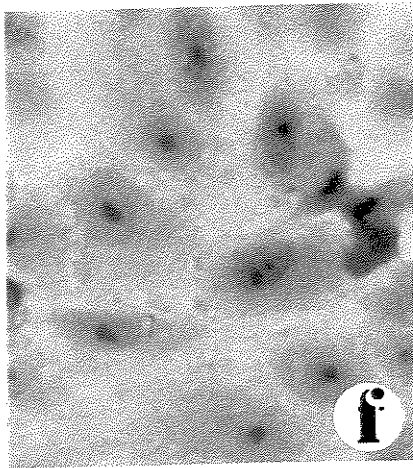
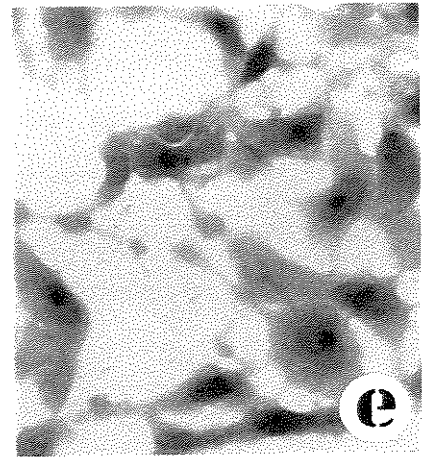
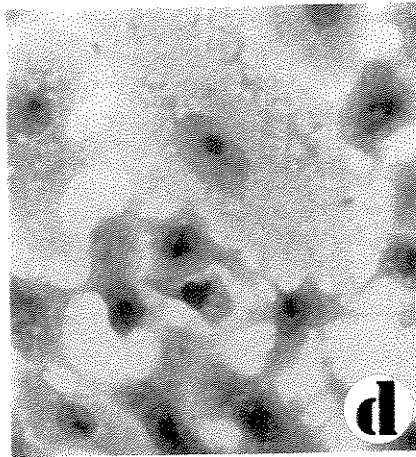
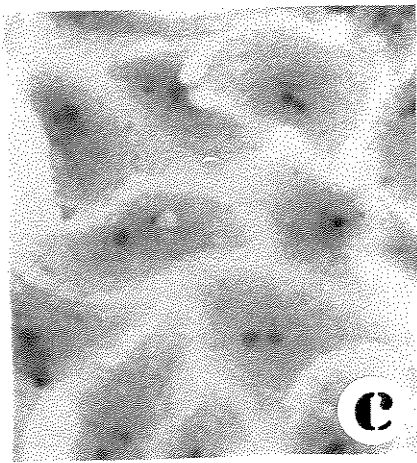
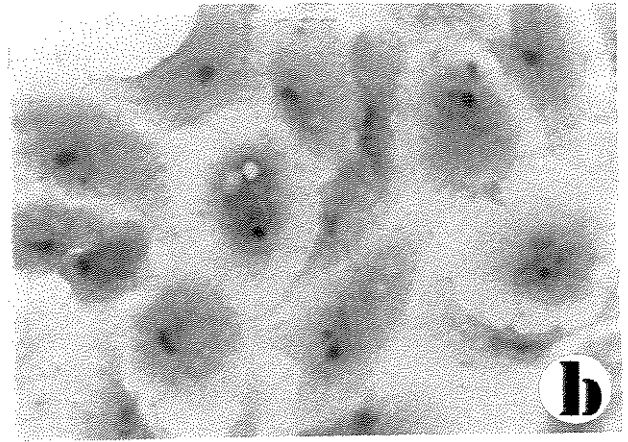
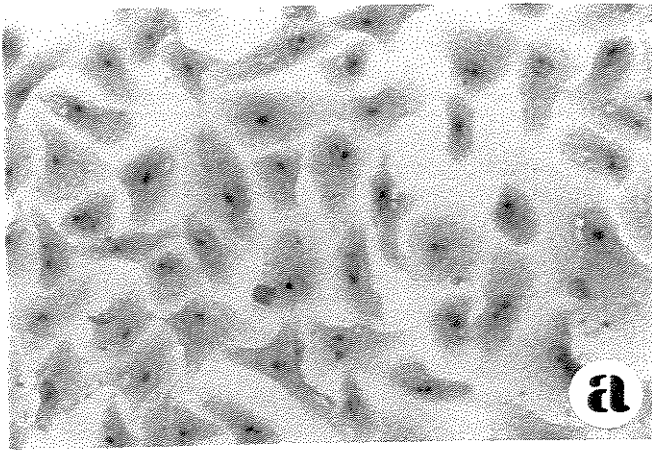
4.4.2 - Anticorpo anti-vimentina (*Figura 4*).

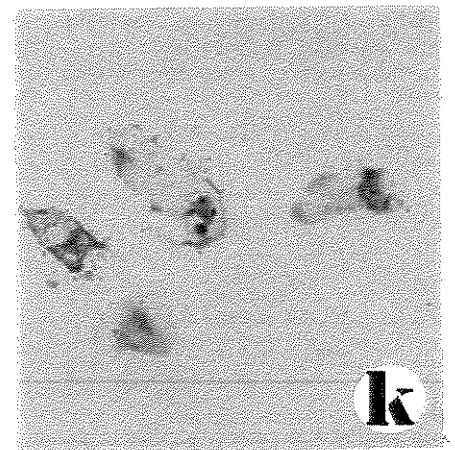
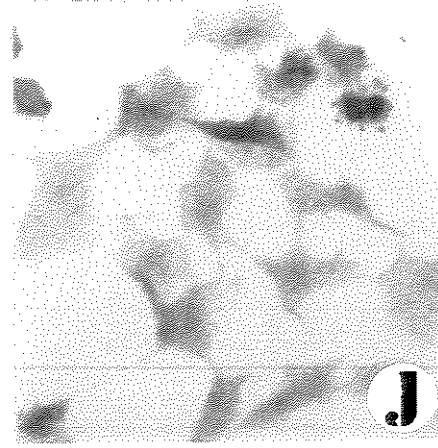
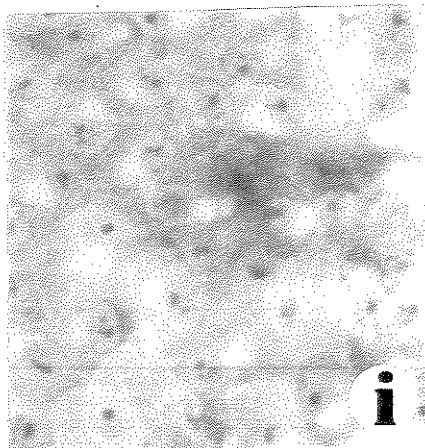
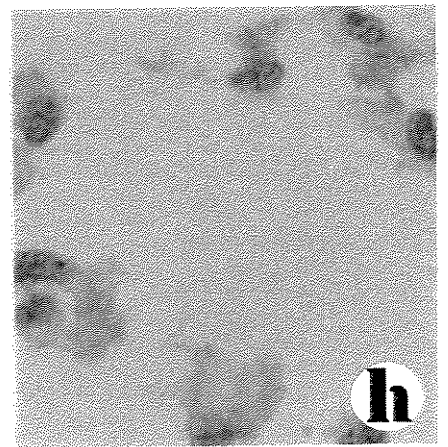
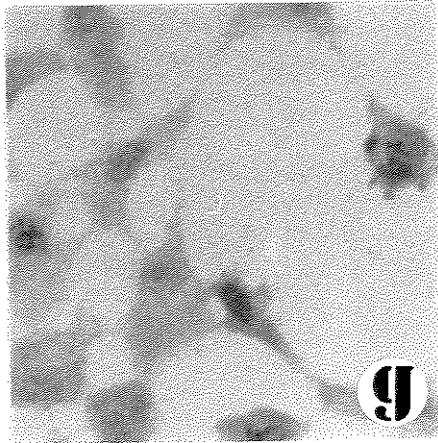
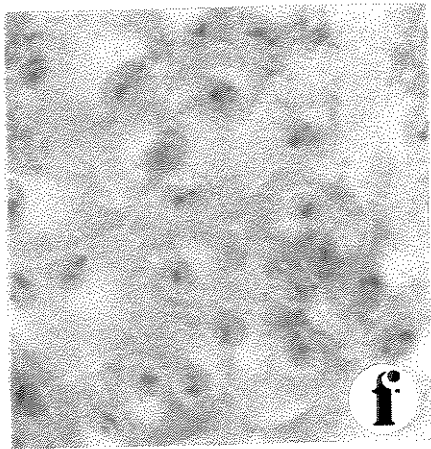
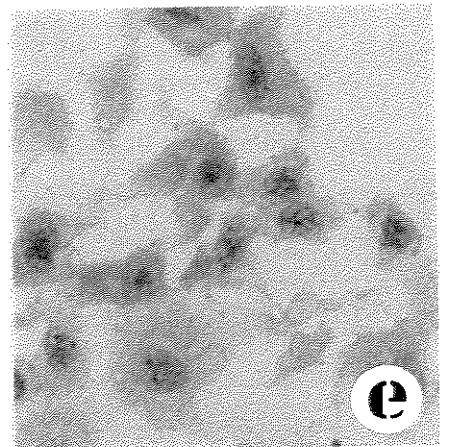
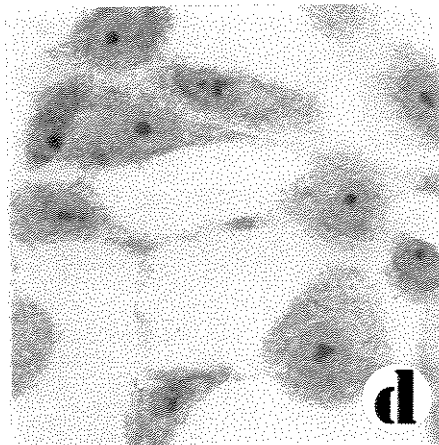
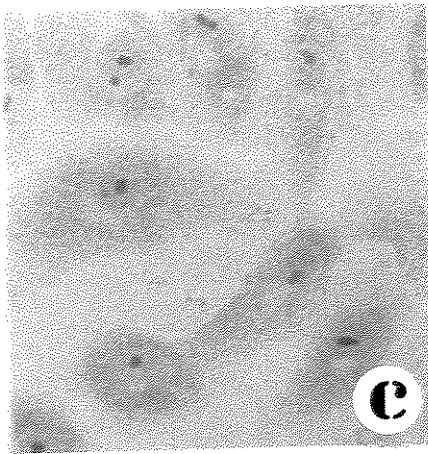
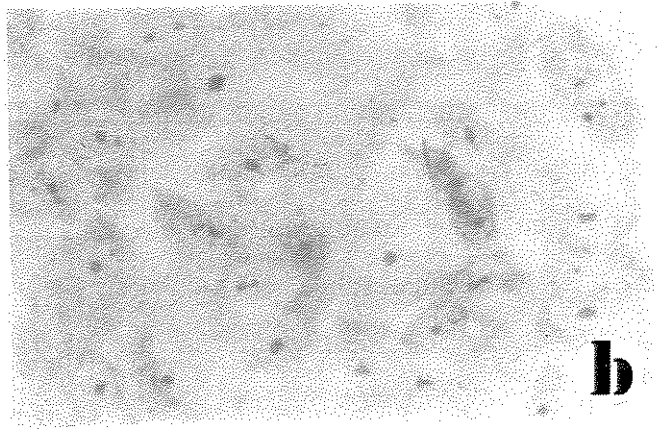
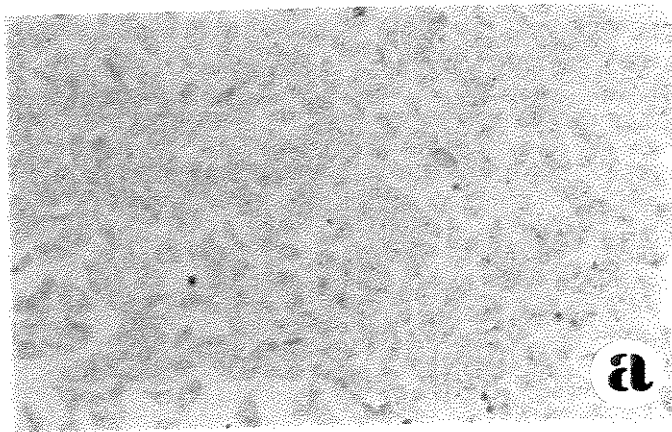
-Com 12 horas de incubação:

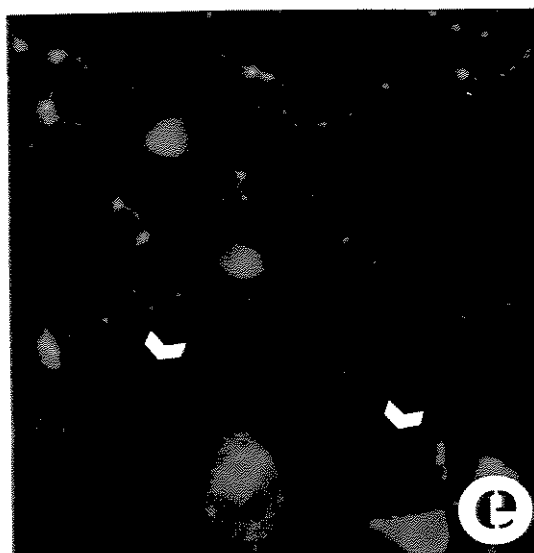
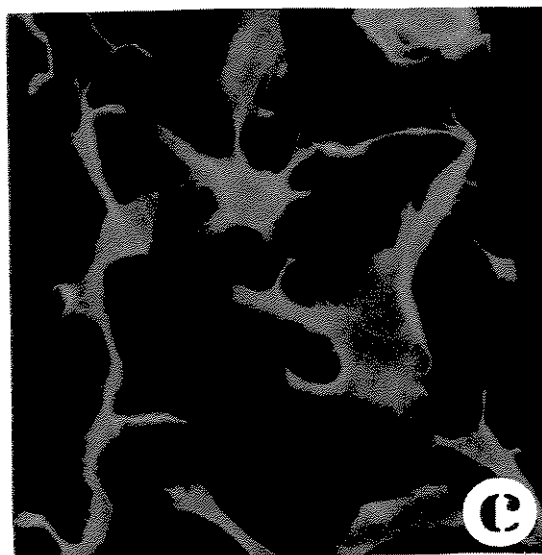
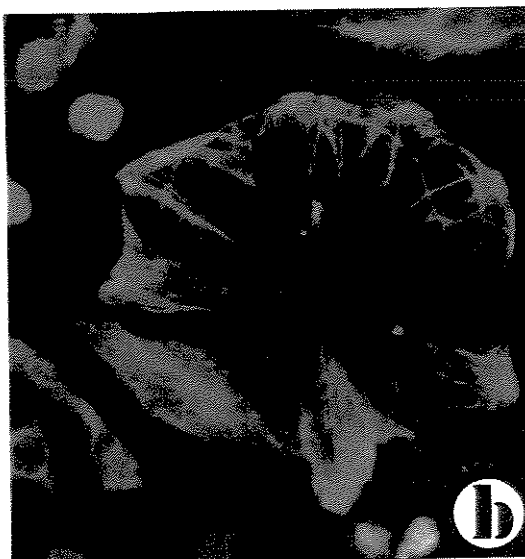
Controle: Os filamentos de vimentina foram observadas e estavam localizadas em todo o citoplasma ou na periferia das células (*Figura 4a*).

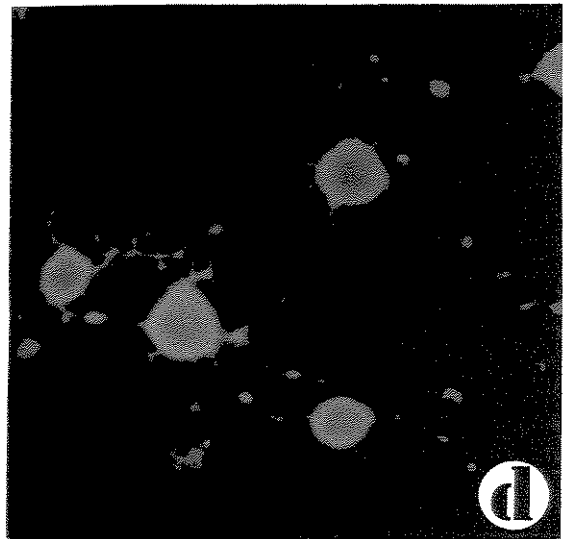
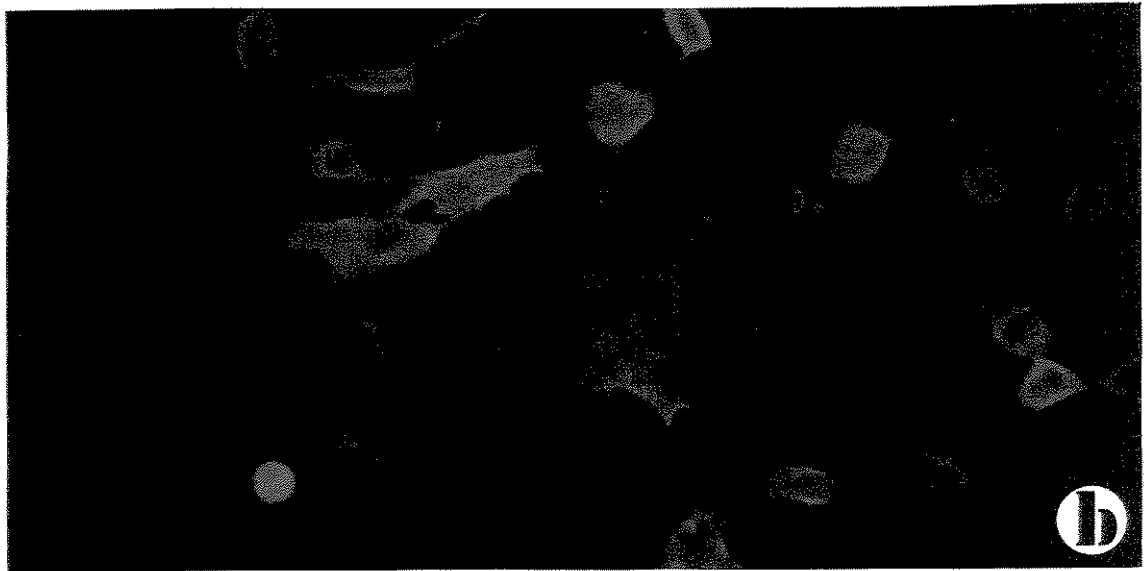
Peso: Os filamentos de vimentina apresentavam-se com distribuição difusa, por toda a célula (*Figura 4b*).

PFOC: Observou-se na zona de transição células com filamentos de vimentina iguais as presentes nas células controle e células com a vimentina distribuída de maneira difusa (*Figura 4-c*). Nas regiões sob o efeito do PFOC existia apenas restos celulares com coloração difusa para vimentina (*Figura 4d*).









5 - DISCUSSÃO

Os perfluorocarbonos líquidos (PFCL) têm sido usados com sucesso no momento intra-operatório das cirurgias vítreo-retinianas, como agente para promover a hemostasia (Moreira Jr et al., 1997), no trauma ocular, descolamentos de retina, luxações do cristalino e complicações da retinopatia diabética, por exemplo. Considerando que estas substâncias são toleradas sistemicamente, seu uso como potencial substituto vítreo está em estudo. As alterações causadas por um tempo maior de contato destas substâncias com as estruturas oculares têm sido avaliadas por diversos pesquisadores. (Chang et. al. 1991, Eckardt et al. 1991, Peyman et al., 1995).

Para alguns autores seu efeito sobre a retina é considerado apenas físico, e dependente do volume de PFCL injetado (Peyman et al., 1995). Outros, além de considerar este efeito, somam um efeito tóxico sobre as células em contato com estes líquidos fluorinados, independentemente do volume (Eckardt et al., 1991).

Os perfluorocarbonos líquidos (PFCLs) são considerados de maneira geral biologicamente inertes como tem sido demonstrado nas avaliações experimentais e clínicas de seu uso como sangue artificial (Mitsuno et al, apud Moreira et al., 1997) e em cultura de células, para aumentar a oxigenação de suspensões celulares (Lu-Kwang Ju et al., 1992). A sua toxicidade retiniana seria causada frequentemente por impurezas na sua formulação (Peyman et al., 1995). Assim, os PFCLs para uso médico devem alcançar índice de pureza próximo a 100%.

Embora os testes de citotoxicidade por nós realizados tenham mostrado que não há a liberação de nenhuma substância tóxica do PFOC para o meio de cultura, as alterações sugestivas de toxicidade celular observadas em nosso experimento, que ocorreram com o contato direto de um PFCL, com alto índice de pureza, com as células em cultura, vão de acordo com os achados de Velikay et al. (1993), que avaliando em olhos de animais o mesmo Perfluorocarbono em duas formulações diferentes, uma altamente purificada e outra não purificada, encontraram alterações celulares tóxicas na retina. Estas alterações como necrose da retina na zona de transição do PFCL, independente da formulação usada, e mais severas, conforme o tempo de contato do produto com as células aumentava, não

podiam ser explicadas apenas pelo efeito mecânico. Estes autores observaram que no produto não purificado estas alterações começaram mais precocemente.

Queiroz Jr. et al. (1992), em modelo animal experimental, deixaram o Perfluorooctano (PFOC) em contato com o endotélio da córnea de coelhos e observaram perda parcial de células endoteliais na área de contato da bolha com a córnea e endotélio normal na área de não contato, sendo que este limite não era nítido, apresentando uma zona de transição.

Em nossos experimentos "in vitro", as alterações morfológicas marcantes observadas nas células sob ação do PFOC, com 6 horas de contato e a faixa de transição no limite das células Vero sob ação ou não do PFOC, com a ausência de um limite nítido, conforme Queiroz Jr. et al. (1992), indicam uma provável ação citotóxica. Nos tempos seguintes, de 12 e 24 horas, as alterações morfológicas e citoquímicas observadas nas células sob efeito do PFOC tornam-se mais acentuadas, sendo que com 24 horas praticamente só temos restos celulares nesta área, enquanto que nas células sob efeito do peso as alterações também aumentam, mas em menor intensidade, podendo-se observar a presença de muitas células íntegras nas áreas.

Queiroz Jr et al. (1992), em modelo animal, deixaram Perfluorocarbonos em contato com a retina de coelhos durante uma hora. Neste material retirado e analisado, em microscopia ótica nenhuma diferença morfológica significativa foi demonstrada entre os olhos tratados com PFCLs e controles. Isto parece mostrar a importância do tempo de ação do PFOC na indução de alterações celulares, fato este também demonstrado por nós "in vitro".

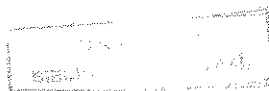
Chang et al. (1991), avaliando a tolerância do PFOC em olhos de porcos deixaram o produto em contato com a retina por aproximadamente 3 horas e não observaram alterações histológicas em relação ao controle. Neste mesmo experimento numa avaliação de tolerância do PFOC a longo prazo em olhos de coelhos observaram alterações histológicas nas camadas retinianas a partir da primeira semana, sendo que estas alterações progrediram resultando no afinamento e mesmo no desaparecimento da camada plexiforme externa, que ficava em contato com o produto. As alterações morfológicas observadas nas células Vero sob a ação do PFOC, com retração celular e concentração do

citoplasma ao redor do núcleo, que evoluem para degeneração celular, parecem mostrar a importância do tempo de contato do PFOC na indução de alterações celulares. Constatou-se que em um mesmo poço onde as células sofriam a ação do produto, na área onde este não cobria o tapete não eram observadas modificações, em relação ao nosso controle, durante toda a duração do experimento. Estas alterações limitadas apenas a área em contato com o PFOC estão de acordo com trabalhos de outros autores que observaram alterações celulares apenas nas partes dos tecidos em contato com a droga (Eckardt et al., 1991; Chang et al., 1991; Queiroz Jr. et al., 1992).

O efeito físico de compressão das células devido a alta gravidade específica do PFOC deve ser esperado, mas os resultados que obtivemos com alterações morfológicas, citoquímicas e imunocitoquímicas, com desorganização e destruição celular, que aumentaram numa proporção mais severa e rápida do que as alterações encontradas nas células que estavam sob o efeito do peso das lamínulas, que exerciam o mesmo peso proporcional, leva a acreditar em um efeito tóxico local, já que seria de se esperar alterações semelhantes às observadas nas células sob o peso das lamínulas se apenas o efeito físico estivesse atuando. Como a pressão é calculada pela força exercida pelo peso dividida sobre determinada área, sendo a lei de Pascal uma adequação desta fórmula para os líquidos e considerando que no experimento a área e o peso das lamínulas e do PFOC eram similares, a pressão exercida sobre as células foi a mesma (Perry R. H. et al, 1980).

O efeito compressivo (físico) do PFOC estaria se somando a um efeito tóxico. Alterações tóxicas na retina (nos fotoreceptores e células de Müller), sob a ação de perfluorocarbonos líquidos também foram encontrados por Eckard et al., (1991) e Chang et al., (1991).

Como conclusão observou-se comprometimento mais pronunciado nas células sob o efeito do PFOC, do que naquelas sob o efeito do peso; as alterações eram maiores conforme o tempo de contato com as células aumentava e o efeito compressivo do peso também levou a alterações celulares progressivas. Considerando que em nosso experimento o efeito mecânico da compressão, gerado pelas lamínulas, levou a alterações celulares progressivas com o aumento do tempo, o objetivo de se obter um substituto vítreo de longo prazo, não tóxico, com boa capacidade de manter a retina aplicada,



portanto com alto peso específico, tem aí um fator limitante. O comprometimento e posterior degeneração que observamos nas células sob efeito do PFOC não indica seu contato, por longos períodos de tempo, com as células da retina. Este perfluorocarbono deve ter seu uso restrito às cirurgias vítreo-retinianas e deve ser totalmente removido após o procedimento cirúrgico.

6 -REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chan C., & Okun E.; The question of ocular tolerance to intravitreal liquid silicone - A long-term analysis. *Ophthalmology*,. 93(5): 651-660, 1986.
- Chang S. Low viscosity liquid Fluorochemicals in vitreous surgery. *American Journal of Ophthalmology*, 103(1): 38-43, 1987.
- Chang S.; Zimmerman N.; Iwamoto T.; Ortiz R. & Faris D. Experimental vitreous replacement with Perfluorotributylamine. *American Journal of Ophthalmology*, 103 (1): 29-37, 1987.
- Chang S. ; Ozmert E. & Zimmerman N.; Intraoperative Perfluorocarbon Liquids in the Management of Proliferative Vitreoretinopathy. *American Journal of Ophthalmology*, 106(6): 668-674, 1988.
- Chang S.; Reppucci V.; Zimmerman N.; Heinemann M. & Coleman J.; Perfluorocarbon liquids in the management of traumatic retinal detachments. *Ophthalmology*, 96(6): 785-792, 1989.
- Chang S.; Sparrow J. R.; Iwamoto T.; Gershbein A.; Ross R. & Ortiz R. Experimental studies of tolerance to intravitreal Perfluoro-N-octane liquid. *Retina*, 11(4): 367-374, 1991.
- Eckardt C.; Nicolai U.; Winter M. & Knop E. Experimental intraocular tolerance to liquid Perfluorooctane and Perfluoropolyether. *Retina*, 11(4): 375-384, 1991.
- Glaser M. B.; Carter B. J.; Kuppermann D. B.; Michels G. R. Perfluorooctane in the treatment of giant retinal tears with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology*, 98: 1613-1621, 1991.
- Green K.; Slagle T.; Chaknis M.; Cheeks L & Chang S. Perfluorocarbon effects on rabbit blood-retinal barrier permeability. *Ophthalmic Res.*, 25: 186-191, 1993.
- ISO 10993-1, 1992. Biological evaluation of medical devices- Part. 5. Tests for cytotoxicity: "in vitro" methods.
- Kirkpatrick C. J. Biological testing of materials and medical devices. A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: citotoxicity in vitro. *Regulatory Affairs*, 4: 13-32, 1992.

- Lu-Kwang J. & Arminger B. W. Use of Perfluorocarbon emulsions in cell culture. *BioTechniques*, 12(2): 258-263, 1992.
- Mathis, A.; Pagot, V.; Gazagne, C. & Malecaze, F. Giant retinal tears. Surgical techniques and results using perfluorodecalin and silicone oil tamponade. *Retina*, 12(suppl. 3): S7-10, 1992.
- Moreira Jr., C.; Uscocovich, C. & Moreira, A. Experimental studies with Perfluorooctane for Hemostasis during vitreoretinal surgery. *Retina*, 17(6): 530-534, 1997.
- Perry, R.H.; Chilton, C. H. *Manual de Engenharia Química*, Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1980.
- Peyman, G.; Schulman, J. & Sullivan, B. Perfluorocarbon Liquids in Ophthalmology. *Survey of Ophthalmology*, 39(5): 375-395, 1995.
- Queiroz Jr., Moreira H., Liggett P. E., Mc Donnell P. J., Özler, A S. Estudo da toxicidade corneana de dois perfluorocarbonos líquidos. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 55(6): 244-248, 1992.
- Queiroz Jr., Özler, A. S., Liggett, P. E.; Moreira, C. A. & Alfaro, V. Experimental intra-operative use of perfluorotributylamine, perfluorodecaline, and perfluoropolyether. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 55(3): 112-115, 1992.
- Sparrow, J.; Jayakumar, A.; Berrocal, M.; Ozmert, E. & Chang S. Experimental studies of the combined use of vitreous substitutes of high and low specific gravity. *Retina*, 12(2) 134-140, 1992.
- Velikay, M.; Wedrich, A.; Stolba, U.; Datlinger, P.; Li W. & Binder S. Experimental long-term vitreous replacement with purified and nonpurified Perfluorodecalin. *American Journal of Ophthalmology*, 116(5): 565-570, 1993.