



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

SIDCLEY BERNARDINO DE ARAÚJO

**BIOINTEGRAÇÃO DO GEL CELULÓSICO PRODUZIDO PELA *Zoogleasp* A
PARTIR DO MELAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR EM OLHOS EVISCERADOS DE
COELHOS**

Recife
2016

SIDCLEY BERNARDINO DE ARAÚJO

**BIOINTEGRAÇÃO DO GEL CELULÓSICO PRODUZIDO PELA *Zooglease* A
PARTIR DO MELAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR EM OLHOS EVISCERADOS DE
COELHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Coorientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Cordeiro Barbosa

Recife

2016

SIDCLEY BERNARDINO DE ARAÚJO

**BIOINTEGRAÇÃO DO GEL CELULÓSICO PRODUZIDO PELA *Zoogleasp* A
PARTIR DO MELAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR EM OLHOS EVISCERADOS DE
COELHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 30/09/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Francisco de Assis Cordeiro Barbosa (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. José Lamartine Aguiar (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Salvador Vilar Correia Lima (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Araújo, Sidcley Bernardino de

Biointegração do gel celulósico produzido pela *zoologlea sp* a partir do melaço da cana-de-açúcar em olhos eviscerados de coelhos / Sidcley Bernardino de Araújo- Recife: O Autor, 2016.

105 folhas : il., fig., tab.

Orientador: José Luiz de Lima Filho

Coorientador: Francisco de Assis Cordeiro Barbosa

Tese (doutorado) ã Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2016.

Inclui referências, apêndices e anexo

- 1. Próteses 2. Olho 3. Biocompatibilidade I. Lima Filho, José Luiz de (orientador) II. Barbosa, Francisco de Assis Cordeiro (coorientador) III. Título**

617.79

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-119

Dedico essa tese a minha querida mãe **Maria Deolinda**, ao meu pai *em*
memória **Enéas Bernardino**, minha esposa **Keilla Leite** e aos meus filhos
Rhayanne, Ana Luiza e Luís Miguel.

AGRADECIMENTOS

A Deus, autor e consumidor da minha fé, por mais esta vitória!

Muito obrigado a todos esses que participaram direta ou indiretamente dessa pesquisa:

Aos Professores e funcionários do LIKA Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, Prof. Dr. Francisco de Assis Cordeiro Barbosa, Prof. Dr. Luiz de Carvalho, Prof.^a Dr^a Mariana Lira, Prof. Dr. Salvador Vilar Correia Lima, Prof^o Dr. José Lamartine Aguiar, Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto, Dr.^a Maria Helena, Doutorando Olávio Campos.

Aos Professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ, em especial Prof^o Dr. Francisco J. B. Sampaio, Prof^o Dr. Waldemar Silva Costa, Prof^o Dr. Diogo Benchimol de Souza, Prof^o Dr. Bruno Felix, Prof^o Dr. Jorge Medeiros, Prof^a Dr^a. Bianca Martins Gregório.

Aos meus familiares, amigos e colegas de trabalhos, inclusive outras pessoas que me ajudaram e por esquecimento não listei aqui, Deus recompense a todos!

RESUMO

Investigar características do processo de integração e biocompatibilidade de um implante de gel celulósico nas cavidades anoftálmicas de coelhos. Analisar a proliferação celular em geral, a angiogênese, a proliferação de células multinucleadas gigantes e a fibrogênese, por técnicas de histomorfometria e imunohistoquímica. Estudo experimental de intervenção empregando 18 coelhos divididos em 6 grupos. O olho direito de todos os animais foi eviscerado e os esquerdos não sofreram nenhum tipo de intervenção. Após a evisceração a bolsa escleral foi suturada e preenchida com gel celulósico. Diariamente, todos os animais foram examinados clinicamente, sob biomicroscopia, até o 7º dia do implante e uma vez por semana até o dia da eutanásia. Os animais foram submetidos a eutanásia e enucleações dos olhos no 7º, 30º, 60º, 90º, 120º e 240º dia após o implante. Os olhos, inclusive os esquerdos, foram avaliados macroscopicamente e processados para análises histopatológica, histomorfométricas, imunohistoquímicas e imunofluorescência. Clinicamente, todos os animais, não exibiram sinais de alergias, intoxicação, extrusão e infecção. Em todos os grupos ao exame macroscópico, histopatológico e histomorfométrico do olho esquerdo, não revelou alterações anatômicas. No entanto, nesta análise, olho direito exibiu redução de 8% no volume do bulbo. O corte do saco escleral mostrou um conteúdo sólido, compacto, elástico, resistente à tração, com superfície lisa e brancacenta. Não foram observados sinais de necrose, ou liquefação. O tecido epiescleral estava algo hipertrofiado. As preparações histológicas estudadas, nas diversas colorações, revelaram uma infiltração linfomononuclear inicial, substituída posteriormente por uma proliferação fibrocitária e histiocitária com formação de células multinucleadas gigantes. Foram também encontrados poucos polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos. A partir do 30º dia houve proliferação vascular e deposição de colágeno em todos os espécimes estudados, embora, no 240º dia do experimento, a resposta inflamatória crônica, a neovascularização e a deposição do colágeno não tinham ainda atingido o centro do implante. Neste modelo, o gel da celulose produzido pela Zoogleia sp, mostrou-se biocompatível e

integrado às órbitas. Fica, portanto, comprovado que o gel celulósico, utilizado neste experimento, além de biocompatível, se integrou às órbitas dos coelhos.

Palavras-chave: Enucleação ocular. Evisceração do olho. Bioprótese. Olho artificial. Biomaterial. Gel celulósico. Implantes orbitários. Biopolímeros. Imunohistoquímica histomorfometria.

ABSTRACT

To evaluate histologically the integration process of cellulose gel produced by *Zoogloea sp* when implanted into rabbits' eviscerated eyes. This experimental study employed 36 eyes of 18 rabbits subjected to evisceration of their right eyes. The sclerocorneal bag was sutured and filled with biopolymer from sugar cane in the gel state. All animals were clinically examined by biomicroscopy until the day of their sacrifice which occurred on the 7^o, 30^o, 60^o, 90^o, 120^o, or 240^o day. The eyeballs obtained, including the left eyes considered controls were sent for histopathological study by optical macroscopy and microscopy. Tissue staining techniques used included hematoxylin-eosin, Masson trichrome (with aniline), Gomori trichrome, Van Gienson, Picrosirius red and periodic acid-Schiff (PAS). No clinical signs of infection, allergy, toxicity, or extrusion were observed throughout the experiment. The corneas were relatively preserved. Macroscopic examination revealed a decrease of ~ 8% in the volume of the bulbs implanted with the biopolymer. After cutting, the sclerocorneal bag was solid, compact, elastic, and resistant to traction, with a smooth and whitish surface, and showed no signs of necrosis or liquefaction. The episcleral tissues were somewhat hypertrophied. The histological preparations studied in different colors revealed an initial lymphoplasmacytic infiltration, replaced by a fibroblastic response and proliferation of histiocytes, along with formation of giant cells. Few polymorphonuclear neutrophils and eosinophils were also found. Neovascularization and collagen deposition were present in all animals starting from day 30; although on the 240^o day of the experiment the chronic inflammatory response, neovascularization and collagen deposition had not yet reached the center of the implant. In this model, the cellulose gel produced by *Zoogloea sp* proved to be biocompatible and integrated into the orbits.

Keywords: Eye enucleation. Eye evisceration. Bioprosthesis. Eye. artificial. Saccharum. Orbital implants. Biopolymers. Immunohistochemistry. histomorphometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 1

Figura 1 ñ	A) Left eye (control). B) Macroscopic appearance of the implanted eyeball showing compact substance, whitish, solid, and surrounded by an elastic sclera with normal color and consistency. C) Orbital aspect of an albino animal that received the implant Gel 210 days earlier. Note that vessels within the implant through the cornea are still partially transparent. D) Final appearance of a human prosthesis on the implant, animal on day 210 of the experiment	48
Figura 2 ñ	The histological study was conducted to identify cells involved in the phenomena of infections, allergies or inflammation (acute or chronic) ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ..	50
Figura 3 ñ	A) Masson trichrome (x100). Biopolymer-cornea Interface: corneal epithelium, membrane of Browman, stroma, and Descemet, relatively preserved. In some points, we see remains of the endothelial monolayer. Deposit of collagen fibers and neovascularization of the implant surdace. B) Masson trichrome-x200: Interior of the implanted gel: lymphocytic infiltration, multinucleated giant cells, neovessels, and collagen deposition represented by tones of blue aniline. C) Hematoxyllin-eosin (HEx200). Interior of the implanted substance: infiltrated lymphoplasmacyte that passes through the scleral tissue and reaches the interior. Histiocytes arranged in multinucleated giant cells forming agranuloma. Presence of vacuoles with biopolymerinthe cytoplasm of these cells. Also observe indicative points of neovascularization. D) Hematoxylin-eosin (HEx100).	

	Sclera-polymer interface: Tissue showing congestion and adema. Scleras showing their characteristic longitudinal fibers. Presence of numerous multinucleated cells .	51
Figura 4 ñ	A) Colored with Picrosirius red (x200) under white light showing the intimacy of the implant where the cytoplasm of multinucleated cells display their large vacuoles containing biopolymers. Note neovessels and collagen fibers invading the interior of the implant. B) Van Gienson: x100: Histopathology of the gel on the interface with the cornea, showing corneal edema. Deposit of collagen fibers between Descemet membrane and the polymer. Neovascularization of the implanted material, as well as the cytoplasm of multinucleated cells. C) Histology aspect of the biopolymer gel implant showing deposition of collagen material between multinucleated giant cells with the sclera. Note greater histiocytic and fibroblastic activity in the periphery and center of the impalnt: periodic acid Schiff (PAS) x100. D) Histopathological aspect of the biopolymer gel implant colored with PAS, to a greater increase (x200), showing in particular the intense magenta colaboration, suggesting the presence of collagen material	55
	Artigo 2	
Gráfico 1 ñ	Média do percentual total de densidade celular segundo o grupo	67
Gráfico 2 ñ	Média do percentual de vasos segundo o grupo	69
Gráfico 3 ñ	Média do percentual de GMC segundo o grupo	70
Gráfico 4 ñ	Média do percentual do percentual de colágeno segundo o grupo	71
Figura 1 ñ	Imunohistoquímica para colágeno tipo I, colágeno tipo III e imunofluorescência indireta para o colágeno tipo I,	

Figura 2 ñ

todos na interface (*) da esclera com implante	73
Imunohistoquímica para antígeno citoplasmático específico em células endoteliais pelo CD31; Células multinucleadas gigantes coradas por HE no animal do grupo G240; Fotomicrografia panorâmica montada do olho do animal número 3 do grupo G90 corada por HE;Detalhe da interface córneo-implante HE 100X	74

LISTA DE TABELAS

Artigo 2

Tabela 1	Densidade de superfície (Sv) da população celular em geral na periferia do implante. Avaliações por animal e por lâmina	67
Tabela 2	Densidade de superfície (Sv) dos vasos formados na periferia do implante. Avaliações por animal e por lâmina	68
Tabela 3	Densidade de superfície da proliferação de células multinucleadas gigantes na periferia do implante Avaliações por animal e por lâmina	70
Tabela 4	Densidade de superfície da deposição de colágeno na periferia do implante. Avaliações por animal e por lamina	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARVO	Association for Researchin Vision and Ophthalmology
CMG	Células Multinucleadas Gigantes
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
FCI	France Chirurgie Instrumentation
FDA	Food and Drug Administration
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
MOE	Músculos Oculares Extrínsecos
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PMMA	Esfera de Polimetilmetacrilato
PSR	Picrosirius Sirius Red
SPSS	Statistical Package for Social Science
Sv	Densidade de Superfície
TG	Tricromo Gomory
TM	Tricrômio de Masson
UERJ	Universidade Estadual do Rio de Janeiro
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
VG	Van Gienson

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo geral	17
1.1.2	Objetivos específicos.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
3	MÉTODO	32
3.1	LOCAL DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS	32
3.2	TIPO DE ESTUDO	32
3.3	SELEÇÃO	32
3.4	PROCEDIMENTOS	33
3.4.1	Cirúrgicos	33
3.4.2	Estudos clínicos	33
3.4.3	Eutanasia	34
3.4.4	Análise macroscópica	34
3.4.5	Preparo do material para estudo histomorfométrico e imunohistoquímico	35
3.4.6	Métodos histoquímicos	35
3.4.7	Histomorfometria das preparações	36
3.4.7.1	Quantificação da densidade de superfície (Sv) de vasos, população celular em geral e células multinucleadas gigantes (CMG)	37
3.4.7.2	Quantificação de colágeno	37
3.4.8	Métodos imunohistoquímicos	38
3.4.8.1	Imunofluorescência indireta	39
3.4.9	Métodos estatísticos	40
4	RESULTADOS	41
4.1	ARTIGO COM RESULTADOS PRELIMINARES DA PRESENTE PESQUISA PUBLICADO NA LÍNGUA INGLESA NOS ARQUIVOS BRASILEIROS DE	

	OFTALMOLOGIA TRADUZIDO O PORTUGUÊS	41
4.2	ARTIGO DOS RESULTADOS COMPLEMENTARES DESTA PESQUISA A SER SUBMETIDO AO JOURNAL INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE THE ASSOCIATION FOR RESEARCH IN VISION END OPHTHALMOLOGY (ARVO)	58
5	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	87
APÊNDICE A	Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes: experimental model in rabbits	95
APÊNDICE B	Effect of sugarcane biopolymer in vocal fold of rabbits Comparative study with calcium hydroxyapatite ..	98
APÊNDICE C	Immunohistopathological changes in murine Schistosomiasis mansoni under the influence of N-acetyl-L-cysteine ...	100
APÊNDICE D	Hydrogel of sugarcane molasses as carrier of one morphogenetic protein in the reconstruction of critical bone defects in rats	103
ANEXO A	Carta de aprovação do Comitê de Ética	105

1 INTRODUÇÃO

Os tratamentos reparadores da cavidade anoftálmica, após as cirurgias de evisceração e enucleação, continuam sendo procedimentos desafiadores e traumatizantes do ponto de vista psicológico, tanto para o doente quanto para o oftalmologista. Atualmente, em todo mundo, continua alto o número de pacientes com indicação formal para esses tipos de cirurgia.¹

São inúmeros os tipos de implantes utilizados para reposição do conteúdo orbitário das cavidades anoftálmicas. Qualquer tipo de implante orbitário, integrado ou não, além dos problemas estéticos, está sujeito a deiscência conjuntival, infecção e extrusão. São considerados implantes integrados àqueles que permitem proliferação celular no seu interior, tornando-se inclusive vascularizados e não apenas àqueles de movimentos integrados implante-prótese.^{2,3,4}

Uso médico da celulose de origem bacteriana tem sido ampliado nos últimos anos. Diferente da celulose vegetal, a celulose bacteriana possui biocompatibilidade, biodegradabilidade, alto teor de pureza (não contém substâncias tóxicas como a lignina), alta estabilidade térmica, alta cristalinidade além de um grande poder de retenção de água. Essas características e propriedades podem atuar como fatores facilitadores no desencadeamento do processo cicatricial, porém sofrem variações de acordo com o sítio de implantação no organismo vivo.^{5,6,7,8,9,10,11}

Dentre os processos de síntese de biopolímero celulósico bacteriano, está aquele desenvolvido, desde 1990, no Laboratório de Microbiologia Industrial da Estação Experimental de Cana de Açúcar ã Carpina, da Universidade Rural de Pernambuco. Trata-se de celulose pura obtida por síntese com bactéria *Zoogleia sp.*, tendo melaço da cana de açúcar como substrato.¹²

No Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco, foi realizada, experimentalmente em coelhos, a reconstrução de cavidades anoftálmicas pós-evisceração usando-se para tal um implante de gel celulósico produzido pela *Zoogleia sp.* Neste caso, o implante mostrou-se integrado, maleável, de superfície lisa e não tóxico para as órbitas de coelhos. Estas qualidades, sem dúvida, podem ajudar nas pesquisas para diminuição da frequência

de extrusão dos implantes orbitários. Todavia melhores estudos, principalmente histomorfométricos e imunohistoquímicos, foram idealizados para melhor qualificar e quantificar as reações de biocompatibilidade e integração deste material ao organismo¹³. A biocompatibilidade representa a capacidade do biomaterial, prótese ou dispositivo permitir ao hospedeiro (paciente ou usuário) realizar uma determinada função sem prejuízo para o organismo. A integração representa o conjunto de reações tissulares, inclusive vascularização do implante, resultantes de uma biocompatibilidade duradoura.^{2,3,4,10,14,15,16}

Todos os biomateriais aplicados em tecidos humanos e animais, sob a forma de próteses ou dispositivos médicos, levam a respostas características desses tecidos (biorreatividade). Essas respostas fazem parte de uma rota fisiopatológica que inclui injúria, interação sangue-material, formação de uma matriz extracelular provisória, reação inflamatória aguda e crônica, formação de tecido de granulação, cicatrização da ferida, reação tipo corpo estranho e resposta fibrosa com encapsulamento do biomaterial. A quantificação destas respostas e o tempo de duração das mesmas tornam-se importantes para o estabelecimento do rendimento, da segurança e da regulação de seu uso.^{14,17,18,19}

Com o objetivo de investigar as características dos processos de integração e biocompatibilidade de um implante de gel celulósico em cavidades anoftálmicas de coelhos, foi proposto o presente trabalho, para avaliar dentro do implante, a proliferação celular em geral; a angiogênese, a proliferação de células multinucleadas gigantes e a fibrogênese por técnica de histomorfometria, além de ratificar a presença da proliferação endotelial e a fibrogênese por técnicas imunohistoquímica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Investigar em cavidades anoftálmicas de coelhos, características dos processos de integração e biocompatibilidade de um implante de gel celulósico

obtido por síntese bacteriana, a partir de melaço de cana de açúcar, desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Industrial da Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina/Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

1.1.2 Objetivos específicos

Em olhos eviscerados de coelhos, expostos ou não expostos ao implante de gel celulósico bacteriano, objetiva-se:

- a) caracterizar a histomorfologia do processo de biointegração;
- b) descrever sobre o processo anatomopatológico;
- c) quantificar a população celular eem específico as multinucleadas gigantes;
- d) quantificar a fibrogênese e a angiogênese;
- e) imunomarcas e localizar a presença de células endoteliais e;
- f) imunomarcas e localizar a presença de colágenos tipo I e III.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Whitnall²⁰ é um dos grandes estudiosos que contribuíram para a construção do conhecimento da órbita e é dele grande parte das informações presentes neste trabalho.

As órbitas são duas cavidades ósseas profundas, separadas pelo nariz, de formato piramidal, com base quadrangular anterior e ápice triangular, e cuja função é proteger o bulbo ou globo ocular. Do ponto de vista da dimensão, cada órbita de um adulto tem 30 cm³ de volume, 35 mm de altura, 40 mm de profundidade e 45 mm de extensão na parede medial.

Denomina-se cavidade anoftálmica a órbita desprovida do globo ocular, podendo esta ser uma condição congênita ou adquirida.

A anoftalmia congênita é um defeito embriológico em que o globo não é formado. Epidemiologicamente, é rara, com incidência de 1,8 a 4,0 para cada 100.000 nascimentos, sem predominância específica em raça ou sexo.²³

Na maioria das vezes, há restos embrionários oculares vistos em exames radiológicos como imagens correspondentes a tecidos oculares colapsados. Avaliações histopatológicas desses tecidos mostram pigmentos remanescentes de tecido uveal e retiniano.^{24,25} Já, a anoftalmia verdadeira é uma condição bem mais rara.

A anoftalmia é uma condição mais comumente bilateral, simétrica ou assimétrica, associada, em mais de 50% dos casos, a outras malformações sistêmicas, decorrentes de fatores ambientais e genéticos, podendo, também, ocorrer de forma unilateral isolada.^{23,24}

A cavidade anoftálmica adquirida é aquela decorrente da perda do globo por trauma ou remoção cirúrgica por meio de enucleação ou evisceração. Algumas das principais indicações para a excisão do globo ocular ou do seu conteúdo são olho cego doloroso, trauma ocular grave, tumor maligno intraocular, endoftalmite não resolvida com antibioticoterapia, bem como para melhora estética de olhos desfigurados.

A enucleação é um procedimento que consiste na retirada do globo ocular e da porção anterior do nervo óptico da órbita, enquanto a evisceração é a retirada cirúrgica do conteúdo intraocular, mantendo-se, entretanto, a esclera e a inserção dos músculos.

O primeiro registro de evisceração foi realizado por James Beer em 1817. Já a enucleação foi descrita por Cleoburey em 1826 e novamente relatada, independentemente, em 1841 por O'Ferral (Dublin) e Bonnet (Paris). Até então, as cirurgias anteriores eram denominadas extirpação do globo ocular.²⁶

A perda ocular é, para o ser humano, considerada uma amputação grave, e que traz inúmeros efeitos sobre o aspecto psicológico. Além da repercussão psicológica relacionada à perda propriamente dita, há ainda efeitos fisiológicos e estéticos causadores de dificuldades de relacionamento social.²⁷

É possível citar duas mudanças fisiológicas essenciais no processo de binocularidade quando um olho é removido: perda completa de estereopsia fina e redução de cerca de 10 a 20% do campo visual do lado afetado.²⁸ Se esse processo ocorre na infância, a adaptação funcional à deficiência é maior, devido ao convívio precoce com as limitações desencadeadas por essa perda e sua integração no processo de modificações naturais do desenvolvimento.²⁷

Esteticamente, é um dano de difícil aceitação, pois o indivíduo que perde um órgão tão importante como o olho sofre modificações bruscas em sua vida, afetando diretamente seu comportamento e modo de agir. A perda ocular pode reativar todo tipo de sentimento, sensações, ideias, imagens e valores próprios de cada indivíduo. Ansiedade, isolamento, depressão e baixa autoestima são as características mais encontradas após o fato.^{27,29}

A interação social é dificultada pela anoftalmia uni ou bilateral. Assim, o desconforto causado pela diferença leva os indivíduos afetados a olhar para baixo, evitando o olhar do outro. O convívio com amigos e familiares em geral, é menos modificado, ocorrendo dificuldade maior em se relacionar com pessoas do sexo oposto e adquirir novos conhecimentos e habilidades.³⁰

Há ainda outros fatores geradores de preconceitos que incluem falta de conhecimento da causa e da doença, medo de contágio, não saber como se

comportar diante da diferença, e pela denominada aliança social, que pode ser explicada como uma tendência evolutiva da espécie em formar alianças e grupos sociais com pessoas mais atraentes e evitar as alianças com pessoas fracas, defeituosas ou desinteressantes.^{29,31,32}

O campo da cirurgia plástica ocular desde há muito tem se preocupado com a reabilitação estética das cavidades anoftálmicas. Assim, o uso de próteses oculares já é bastante documentado desde a época dos egípcios, cerca de 2000 antes de Cristo, que utilizavam olhos artificiais como adorno para suas múmias. Esse mesmo procedimento era seguido pelos gregos e romanos, utilizando ouro e pedras preciosas.³³

Em pessoas vivas, foi Ambroise Paré (1510-1590), um cirurgião francês, quem descreveu o uso de olho artificial para repor a perda ocular por traumas e doenças. A prótese era confeccionada de ouro e prata, de dois tipos distintos: *ekblephara* e *hypoblephara*, destinadas a serem utilizadas, respectivamente, na frente, ou abaixo das pálpebras³⁴. Nesse mesmo período, as primeiras próteses de vidro começavam a ser fabricadas em Veneza, sendo posteriormente aperfeiçoadas pelos franceses e alemães. Ludwig Müller - Uri, um soprador de vidro alemão, que confeccionava olhos artificiais para bonecas, impressionou um oftalmologista local, em 1835, que solicitou que fizesse modelos semelhantes para seus pacientes utilizarem como prótese ocular.³⁵ Essas próteses passaram a ser utilizadas sob as pálpebras, como finas conchas, recobrindo um globo atrofiado ou ausente, sem, entretanto, repor o volume perdido.

Até a Segunda Guerra Mundial, as próteses oculares utilizadas eram de vidro, fabricadas por empresas alemãs. Após esse período, foram desenvolvidos outros materiais, como o metilmetacrilato, com maior disponibilidade e mais fácil manuseio.

A Odontologia trouxe algumas contribuições, pois as próteses utilizadas atualmente foram adaptadas de materiais e técnicas empregadas desse segmento. Elas possibilitam a confecção de próteses leves, sob medida e de longa durabilidade.³⁶ Em pesquisas realizadas sobre o nível de satisfação dos usuários de prótese ocular, cerca de 70% dos participantes consideraram-se satisfeitos com o resultado final.^{27,37}

Os implantes orbitários são fundamentais no processo de preparação de uma cavidade para adaptação da prótese externa, uma vez que permitem a reposição de grande parte do volume perdido com a remoção do olho ou do seu conteúdo, causando menores deformidades palpebrais.

A colocação do implante pode ser primária, quando se realiza concomitante à cirurgia de enucleação ou evisceração, ou secundária, ou seja, em outro tempo cirúrgico, como em casos de determinadas neoplasias ou infecções associadas, em que não seja possível a colocação do implante orbitário naquele momento.

A classificação dos implantes os divide em integráveis (ou porosos) e não integráveis (ou não porosos). Os implantes não integráveis são inertes e se mantêm sem modificações após a sua colocação, permanecendo separados do receptor devido ao seu encapsulamento. O implante integrável é o que possui crescimento fibrovascular do hospedeiro no seu interior, o que o transforma em tecido vivo dentro do organismo.³⁸

O primeiro implante na órbita foi realizado por Phillip Henry Mules, em 1885, em uma cirurgia de evisceração, o qual consistia em uma esfera de vidro oca. O fato foi considerado um marco na história das reconstruções das cavidades anoftálmicas e dos implantes orbitários. Em seu primeiro relato, de nove pacientes operados, somente em quatro não houve extrusão. No ano seguinte, Frost introduziu o mesmo implante na órbita após enucleação, mas, de seis cirurgias realizadas, em apenas uma não houve extrusão.^{33,35}

Embora o vidro fosse o material mais utilizado para a confecção de implantes, no início do século XX, uma variedade de outros materiais, tanto orgânicos (cartilagem, osso, marfim, gordura) como inorgânicos (ouro, prata, cobre, alumínio) foram introduzidos na sua fabricação, como tentativa de se descobrir um material menos reativo.³⁸

Com a Segunda Guerra Mundial, houve redução do fornecimento de vidros pelos alemães, e devido ao número crescente de soldados e civis com perda ocular, houve a necessidade de se produzir próteses com materiais de fácil manuseio, mais baratos e inertes.^{35,36} Dessa necessidade surgiu a esfera de polimetilmetacrilato

(PMMA), uma espécie de plástico acrílico, cuja biocompatibilidade foi descoberta nessa época.

Os primeiros relatos dos implantes integráveis são de 1973, quando Molteno, em uma cirurgia de enucleação, colocou uma esfera derivada de osso de mamífero. No entanto, o crescimento de tecido fibrovascular para o interior dos poros só pôde ser documentado em um espécime 10 anos após, em pós-morte.³⁸

Perry, em 1985, após dois anos de experimento animal apresentou o implante integrável de Hidroxiapatita (HA). E em 1989, o implante, com o nome de Bio-eye® (Bio-eye, Integrated Orbital Implants, EUA) foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para colocação na órbita.

O material é um sal de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), que se encontra de forma natural como parte mineral do osso humano, obtido de um coral marinho, do gênero *Porites*, e convertido de carbonato de cálcio (CaCO_3), por meio de uma reação hidrotérmica, a fosfato de cálcio ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).³⁹

Na Odontologia e Ortopedia, a HA já era utilizada como substituta de enxertos ósseos. A HA apresenta um sistema de poros interconectados, que quando implantado, em contato com ossos normais, possibilita novo crescimento ósseo dentro dos canais, e se colocada em tecidos moles, permite o crescimento de tecido fibrovascular em suas cavidades, sem desenvolver reação significativa de corpo estranho e não promove encapsulamento.² Os canais formados são naturalmente interligados e possuem diâmetro variável de 300 a 700 μm .

Desde 1991, outro material utilizado é o polietileno poroso (PP). O implante é feito por material sintético, formado pela polimerização de moléculas de etileno sob alta pressão e temperatura.⁴⁰ Os poros dos implantes de PP variam de 100 a 500 μm , no implante Medpor® (Porex Surgical Inc., EUA).

Há algumas vantagens do PP em relação ao HA: menor custo, maior facilidade para manufaturar em diversos formatos, com porosidades estendendo-se até 1000 μm e a possibilidade de suturar os MOE diretamente no implante, sem a necessidade de revestimento.^{41,42}

Devido à crescente preocupação ambiental e destruição de corais marinhos para retirada e obtenção da HA, em 1998, a empresa francesa France Chirurgie

Instrumentation, France (FCI) começou a produzir HA sintética. Esse material passou por várias fases até chegar à forma atual que corresponde à sua terceira geração. O FCI3 tem uma composição química similar a da HA coralina, com pequenas diferenças na uniformidade dos poros observadas à microscopia eletrônica.⁴

Outros tipos de implantes de HA também foram desenvolvidos, como a HA bovina, chinesa e brasileira. A HA brasileira, elaborada por Soares, composta de 75% de HA e 25% de óxido de alumínio, é mais pesada que a HA coralina e possui uma aparência sólida, com presença de porosidades, mas sem interconectividade entre os poros. Em estudo comparativo realizado em animais, demonstrou-se crescimento de tecido fibrovascular em seu interior, porém foi identificado um material amorfo enegrecido não birrefringente, que pode estar relacionado à manufatura do implante, e não oferece segurança em relação à toxicidade.⁴³

Mais recentemente, na tentativa de encontrar um implante com uma tolerância ainda maior, surgiu o implante orbital de biocerâmica, feito de óxido de alumínio (Alumina, Al_2O_3). O material já vinha sendo utilizado em implantes

Descrito pela primeira vez o enxerto dermo adiposo constitui uma opção de reposição de volume da cavidade anoftálmica. Entretanto, a grande desvantagem é o risco da reabsorção gordurosa.^{44,45}

Inicialmente, usado em casos de extrusão ou migração de implantes, o enxerto dermo adiposo tem sido utilizado como implante primário em enucleação e também em evisceração com esclerotomia, com ótimos resultados cosméticos, sem sinais de migração ou extrusão, com bom preenchimento da cavidade e reabsorção somente em casos relacionados a cavidades com condições desfavoráveis a qualquer implante, como irradiação, queimadura química e infecção.^{46,47,48}

Com a remoção do olho, a perda média de volume é de cerca de 7,0 mL, podendo variar de 4,0 a 9,0 mL, dependendo do tamanho do globo. Um implante de 18 mm de diâmetro repõe 3,1 mL de volume. Um implante de 20 mm repõe 4,2 mL de volume e um de 22 mm, 5,6 mL de volume. Já a prótese ocular externa, tem idealmente 2,0 a 3,0 mL de volume. Assim, um implante ideal, para repor o volume orbital após a remoção do globo, deve ser de 20 a 22 mm de diâmetro.^{38,43,49}

Em cirurgias de enucleação, o tamanho médio dos implantes mais utilizados é de 20 ou 22 mm de diâmetro, e em cirurgias de evisceração, com a técnica de esclerotomia posterior, em geral, o implante utilizado tem 18 mm de diâmetro, no máximo 20 mm e sem esclerotomia posterior, 16 mm de diâmetro, no máximo 18 mm.^{50,51}

Algumas complicações são esperadas para o implante orbitário (integrável ou não), seja em cirurgia de enucleação, evisceração. Dentre as mais comuns, é possível citar enoftalmo e deformidade de sulco palpebral superior, resultantes de reposição inadequada de volume. Mas as complicações mais temidas são a migração (mudança na posição do implante depois de colocado) e a exposição/extrusão (defeito no tecido que recobre o implante), seja por prótese ocular mal adaptada, por infecção ou pelo tamanho exagerado do implante que podem contribuir, inicialmente, para a exposição do implante e, posteriormente, para a sua extrusão.⁴²

Os materiais mais comumente usados em cirurgia geral, como próteses integradas, são o polipropileno, o politetrafluoretileno expandido (PTFEe), o poliéster (Mersilene/Dacron). Esses materiais foram introduzidos na prática médica nos fins dos anos cinquenta, do século passado. As fibras de polipropileno podem ser trançadas em diferentes densidades e desenhos e, além de serem monofilamentares ou multifilamentares, possuem boa estabilidade mecânica, resistência, elasticidade e não sofrem biodegradação nem fotodegradação. Seus poros medem entre um e dois milímetros (macroporos maiores que 75µm) e produzem uma reação inflamatória de longa duração que depende da textura e quantidade de material da prótese. Como consequência da resposta inflamatória causada pela prótese de polipropileno, ocorre sua retração. O tetrafluoretileno expandido possui microporos (menores que 10µm), entretanto, pode ser trançado junto com o polipropileno (prolene) ou o poliéster (Mersilene/Dacron), além disso, o tetrafluoretileno pode também ser perfurado industrialmente. Outro tipo de prótese sintética é etileno tetraftalato, dentre as quais a mais popular é a Mersilene, formada por polímeros de carbono (poliester) e, ao contrário do polipropileno que é hidrofóbico, tem uma estrutura hidrofílica.⁵² Os materiais como o silicone (silastic),

membrana de pericárdio ou dura-máter possuem poros de tamanho submicrométricos, porém, podem ser usadas em combinação com outros produtos. Polímeros absorvíveis, como a poligalactina, podem ser usados em combinação com o polipropileno na construção de próteses (telas) de baixo peso.^{53,54}

O organismo reage de forma diferente à presença de próteses sintéticas ou enxertos. A resposta inflamatória aos materiais sintéticos depende do tamanho dos poros e do tipo de trançado. Nessa perspectiva, a presença de poros maiores que 75 micra (μm) permite uma infiltração celular através do trançado da tela, com a penetração de neutrófilos e macrófagos. Isso confere uma maior proteção à infecção, formação de neovascularização e deposição de colágeno através da mesma, o que permite sua incorporação ao tecido do hospedeiro. Poros menores do que dez μm impedem a penetração dos macrófagos ($>50\mu\text{m}$) na prótese e dificultam o acesso às bactérias ($1\mu\text{m}$), mesmo assim, favorecem a infecção.^{54,55,56,57}

A celulose está entre os biopolímeros mais comumente encontrados na natureza e está presente em 40% a 50% de quase todas as plantas. Outras fontes de celulose em menor proporção são encontradas em bactérias, algas marinhas, alguns frutos como o algodão, gramíneas-monocotilêdoneas, como por exemplo: bagaço de cana, bambu, palhas de cereais, além da forma de celulose artificial como viscose e *rayo*.⁵⁸

A estrutura e as propriedades mecânicas da celulose bacteriana diferem da celulose produzida a partir das plantas, apesar de ambas possuírem a mesma composição química, caracterizada como um polímero composto por um grande número de unidades repetidas, constituídas da condensação da D-glicose (um açúcar simples ã monossacarídeo hexose). A designação D refere-se à posição do grupo hidroxila (OH) localizada à direita do átomo de carbono (C) assimétrico mais distante do grupo aldeído. Esses polímeros podem ser classificados em homopolímero, quando as unidades são idênticas, e em heteropolímeros, quando as unidades são constituídas por dois ou mais tipos de monômeros.⁵⁹

Quando comparada à celulose extraída das plantas, a celulose bacteriana possui propriedades mecânicas mais fortes no que diz respeito à resistência, melhor capacidade de retenção hídrica, tornando possível moldá-la durante sua síntese,

além de alta biocompatibilidade e cristalinidade. Diferente da primeira, a celulose bacteriana é altamente pura e livre de componentes biogênicos (lignina, pectina, entre outros). Outra característica importante dos biopolímeros de origem bacteriana é seu alto grau de regularidade, isentos de flutuações de ordem climática ou sazonal.⁶

Nos últimos anos, o interesse pela celulose produzida por via microbiológica vem aumentando em virtude das inúmeras aplicações comerciais deste biopolímero, como alternativa à fabricação de pele artificial, diafragmas acústicos, membranas de filtros e na cicatrização de feridas.¹¹ Na indústria farmacêutica e médica, esse material vem sendo testado como substituto de tecidos vasculares, arcabouço de tecidos cartilagosos, substrato para cultura de células, curativos biológicos para queimaduras e na fabricação de próteses.⁶⁰ Além disso, é usado também como substituto de órgãos ocos, como ureter, traqueia, tubo digestivo, e ainda como bainha para reconstrução de nervos, substituto da dura-máter e reparo de hérnias.^{61,62,63}

Na Ásia, a celulose bacteriana em sua forma desintegrada tem sido utilizada na alimentação, como agente espessante, e na dieta, sob a forma de fibras suplementares.⁶²

A celulose bacteriana pode ser descrita como uma membrana semitransparente, constituída por uma rede de fibrilas de celulose, de dimensões nanométricas, produzida por bactérias, particularmente as Gram-negativas, cujo representante mais importante é o *Acetobacter xylinum*.⁶⁴ Os testes de biocompatibilidade *in vivo* demonstraram que a celulose produzida pelo *Acetobacter xylinum* não produziu sinais macroscópicos inflamatórios e nem sinais histológicos compatíveis com inflamação crônica e reação ao corpo estranho. Observou-se também uma integração satisfatória da membrana de celulose ao tecido do hospedeiro.⁶⁵ Diante dessas características favoráveis à aplicabilidade na medicina, passou-se a utilizá-la em inúmeras pesquisas na área de engenharia de tecidos, como arcabouço de próteses vasculares e tecidos cartilagosos.⁶⁶

Um biopolímero obtido por síntese bacteriana, a partir de melaço de cana de açúcar foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Industrial da Estação

Experimental de Cana de Açúcar de Carpina/Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), desde 1990.^{67,68} Trata-se de um exopolissacarídeo produzido a partir da bactéria *Zooglea sp*, isolada no Departamento de Antibióticos da mesma universidade. Esse biopolímero está sendo utilizado para o desenvolvimento de próteses com aplicação em diferentes subáreas da cirurgia. No Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE, o biopolímero *in natura* foi tratado e resultou em uma estrutura química polimérica não absorvível, biocompatível, com baixa toxicidade e com características físicas que atendem às especificidades morfofuncionais de diferentes tecidos, permitindo a sua aplicação como enxerto biológico.^{66,69,70} A estrutura química desse biopolímero é constituída por diferentes monossacarídeos: glicose 87,57%, xilose 8,58%, ribose 1,68%, ácido glicurônico 0,83%, manose 0,82%, arabinose 0,37%, galactose 0,13%, ramnose 0,01% e fucose 0,01%.¹¹

Na área de saúde, pesquisadores testaram o biopolímero de cana-de-açúcar, em seu estado bruto, para cicatrização de feridas cutâneas em animais, demonstrando um aumento do tecido de granulação, controle da infecção e diminuição do tempo de cicatrização. O biopolímero, constituído de açúcares, forma uma película estável que, em contato com as secreções da ferida, libera uma quantidade de açúcar capaz aumentar a concentração do meio e torná-lo hiperosmolar. Essa liberação se processou de forma gradual, com a presença do exsudato da ferida, por conta da estabilidade da membrana, diferente do que acontece quando se utiliza açúcar nas feridas infectadas, pois, com substâncias, é rapidamente diluído devido à ação higroscópica, o que se explica a necessidade de várias aplicações ao dia para o efeito ser mantido.⁶⁸

Em seu estado de pureza, o biopolímero apresenta baixa citotoxicidade, alta biocompatibilidade, elasticidade, resistência à tração, flexibilidade e ainda pode ser modelado em diferentes formas, preenchendo, assim, as exigências necessárias para manufatura dos implantes biológicos.^{71,72,73} Em razão disso, foi criado um grupo de pesquisa interdisciplinar, denominado Biopolímero da Cana-de-Açúcar, com o objetivo de desenvolver estudos sobre as características físico-químicas dessa membrana celulósica e sua utilização na área de saúde (patentes e registros).

Em 2005, estudando-se este biopolímero, constatou-se sua capacidade de substituir tecidos biológicos com boa tolerabilidade e pequeno grau de reação inflamatória.⁷³ Outros trabalhos publicados demonstraram a aplicação experimental do biopolímero da cana-de-açúcar como: substituto de enxerto na miringoplastia⁷⁴; enxerto vascular^{75,76}; tratamento da incontinência urinária através de *sling*⁷⁷; realização de uretroplastia⁷⁴; reconstituição da túnica albugínea; tratamento do refluxo vésico-uretral⁷⁸; e o curativo após cirurgia de hipospádia.⁷³

A maioria dos cirurgiões oftalmológicos, nos últimos anos, têm abandonado o uso de próteses orbitárias não integradas (polimetilmetacrilato), bem como aquelas construídas a partir de polímeros vegetais. No caso dessas últimas, justificam a conduta, afirmando que aqueles polímeros são ásperos, rugosos e alérgenos, predisponentes, portanto, para a extrusão tanto quanto os não integrados.^{2,3}

Mesmo usando qualquer dos implantes integrados existentes, há possibilidade de se desenvolver deiscência conjuntival. Várias são as causas para as deiscências, uma delas poderia ser o fato de que os implantes se movimentam em conjunto com o conteúdo orbitário e as próteses externas poderiam ocasionar traumas repetidos para a superfície conjuntival. Esferas que não fossem constituídas de materiais rígidos poderiam ter vantagens neste sentido. Assim, Ferraz et al.⁷⁹, idealizou uma esfera composta por uma substância no estado gelatinoso, composta de polietileno gel, o que deixaria o contato entre a mucosa conjuntival e a prótese externa menos traumático. Os implantes biocompatíveis, como citado anteriormente, sofrem vascularização progressiva, resultando na integração entre a esfera e o hospedeiro. A avaliação dessa integração pode ser feita utilizando-se métodos de custo elevado, como a tomografia computadorizada ou a ressonância magnética. No estudo prévio dos mesmos autores, embora não tenha sido exequível um implante padrão com o polietileno gel, foi possível constatar que há possibilidade de se avaliar a integração das esferas por meio de exames ultrassonográficos.

Além dos movimentos oculares, alterações significativas podem ser observadas quando o paciente usa um implante com prótese. Entre as variáveis estudadas, podemos observar: diminuição da altura do sulco palpebral superior, aumento da área da fenda palpebral e aumento dos ângulos palpebrais interno

eexterno. O tipo de cirurgia executada (enucleação ou evisceração), tamanho da prótese usada, a profundidade da implantação, a espessura e o peso da prótese externa tem muita importância no resultado final. A elasticidade da pálpebra inferior pode diminuir com a idade e influenciar demasiadamente na movimentação do implante. Tudo isso se traduz na necessidade do uso de implantes mais leves.⁸⁰

A eficiência da transmissão dos movimentos do implante para a prótese determina o grau de motilidade do olho artificial. O movimento é transmitido do implante orbitário para a superfície de tensão localizada na interface olho artificial ã conjuntiva, bem como para o fórnix. O implante orbital do tipo *quad-motility*, em virtude de sua proeminência anterior, possui um melhor acoplamento com o olho artificial, transmitindo-lhe, portanto, um maior movimento. Por outro lado, esses implantes são mais largos e pesados. Isso implica, teoricamente, em maior força erosiva no ápice da conjuntiva e maior peso sobre a pálpebra inferior. Mais uma vez a literatura disponível fala a favor do uso de implantes mais leves.²

Embora tenha sido usado como curativo corneano em animais,^{81,82} não existem relatos na literatura oftalmológica do uso do biopolímero de celulose produzido a partir de síntese bacteriana como prótese orbitária. Porém, em função da sua baixa citotoxicidade, da plasticidade funcional e da grande capacidade de integração aos organismos, esse biopolímero, diferentemente de outros implantes integrados, poderá ser um excelente material substitutivo para o globo ocular enucleado ou mesmo eviscerado.^{6,7}

O modelo experimental em coelhos tem sido usado com frequência na oftalmologia.^{8,9,11,18} Em pesquisas para doenças inflamatórias, o modelo experimental em coelhos tem permitido comparações com reações dos tecidos humanos.^{8,9} Por esses motivos, acredita-se que o citado modelo seja suficiente para estudar de forma generalista e pioneira, as reações dos tecidos oculares remanescentes da evisceração, à implantação de um biopolímero. Poderiam ser avaliados vários eventos, entre os quais: a neovascularização; o depósito remodelador de colágeno; proliferações fibroblástica, monomorfonuclear e histiocitária no tecido escleral remanescente, músculos extraoculares, cápsula de

Tenon e conjuntiva, dos olhos de coelhos eviscerados e recompostos com próteses gel da celulose, produzida pela *Zoogloea*.

Face ao exposto, foi proposto um modelo experimental de manipulação cirúrgica, observação, sacrifício e estudo anatomopatológico *post-mortem*, em coelhos.

Não obstante os muitos estudos e diferentes materiais disponíveis no mercado, ainda não é possível apontar um implante ideal, o qual deveria ter características como: material biocompatível, integração à órbita, fácil inserção, reposição adequada de volume, suporte adequado à prótese ocular, baixo índice de complicações relacionadas à migração, exposição e extrusão, além de custo acessível.^{83,42}

3 MÉTODO

3.1 LOCAL DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE), em convênio com a Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), realizada no período de 2012 a 2015, dentro dos preceitos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, sob CAAE nº23076.005297/2008-87. Respeitando os princípios propostos pela Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO).

3.2 TIPO DE ESTUDO

Estudo experimental, longitudinal e descritivo.

3.3 SELEÇÃO

Foram utilizados trinta e seis bulbos oculares oriundos de dezoito coelhos machos albinos da raça Califórnia, saudáveis, jovens (com cinco meses de idade) e peso médio de 2,600 kg.

A escolha de coelhos, como animal de experimento, obedeceu à recomendação das pesquisas oftalmológicas translacionais, envolvendo próteses e implantes humanos.¹⁴

Os coelhos foram distribuídos em seis grupos, cada um com três animais, tomando por critério o dia de eutanásia, dada a necessidade de análise dos fenômenos cicatriciais do implante, tomando o olho contralateral como controle.¹³ Os grupos foram designados com um numeral representativo do período de vida após implante da prótese (G7 com eutanásia ao sétimo dia, G30 ao trigésimo dia, e assim por diante, nos grupos G60, G90, G120 e G240).

3.4 PROCEDIMENTOS

3.4.1 Cirúrgicos

Os animais foram operados pelo mesmo cirurgião oftálmico e receberam visitas diárias do médico veterinário durante os 240 dias do experimento. Cada coelho foi anestesiado com injeção intramuscular da solução de ketamina (0,35 ml/kg peso) e xilasina (0,25 ml/kg peso). Após evisceração do olho direito, o saco esclero-corneano foi suturado continuamente com Vicryl® 6.0. A cápsula de Tenon e a conjuntiva foram suturadas separadamente da esclera em pontos contínuos com fio Vicryl® 7.0. Para facilitar exames pós-operatórios, a córnea não sofreu recobrimento conjuntival. Depois de suturada, a cavidade foi preenchida totalmente com gel celulósico bacteriano sintetizado por *Zooglea sp*, em substrato de melaço de cana-de-açúcar, previamente esterilizados por irradiação gama.¹³ Os eventuais locais de vazamentos ao longo da sutura escleral, foram corrigidos com pontos isolados do mesmo material. Nestes olhos operados, uma combinação de dexametasona e ciprofloxacino, na apresentação farmacêutica de pomada (Cilodex®) foi aplicada, uma vez por dia, durante os primeiros sete dias da experiência. Os animais com suspeita de dor foram tratados com Dipirona sódica, 50 a 100 mg/kg por via subcutânea, a cada oito horas.

3.4.2 Estudos clínicos

Todos os animais foram submetidos a exame de biomicroscópico do segmento anterior de ambos os olhos com uma lâmpada de fenda. Este exame foi inicialmente realizado a cada 24 horas e após o 7º dia, semanalmente, até o dia do sacrifício. Estes testes foram conduzidos principalmente para observar os seguintes sinais:

- a) na conjuntiva: edema, hiperemia, quemose, deiscência de ferida cirúrgica, extrusão, secreção aquosa, mucosa, serosa e sangrenta purulenta e hipertrofia celular (papilar, folículos e granulomas);

- b) na córnea: e pithelial escoriações, úlceras, "derreter", perfuração, parenquimatosa turvação, turvação endotelial, precipitados keratic, pannus e leukoma.

3.4.3 Eutanasia

A eutanásia dos animais foi executada com o uso de pentobarbital sódico a 18% (200mg/ml) por via intraperitoneale iniciou-se a partir do sétimo dia após a cirurgia. Seguido do grupo G30 ao trigésimo dia, e assim por diante, nos grupos G60, G90, G120 e G240.

3.4.4 Análise macroscópica

Todos os animais tiveram os dois olhos enucleados e seus bulbos oculares imediatamente colocados em solução de formalina 10% tamponada por um período de 48 horas. Após a fixação completa, um exame macroscópico foi realizado e realizado em 2 etapas:

A primeira fase envolveu medir os diâmetros (tamanhos) de bulbos, direito e esquerdo, por uma pinça de precisão digital, bem como a descrição externa, juntamente com os tecidos peri-ocular, usando uma lupa estereotóxica Olympus com uma ampliação de de de .

Na segunda etapa, as os bulbos foram cortados em um plano sagital em seus maiores diâmetros formando 2 tampas aproximadamente iguais, sempre em pares, direita e esquerda, com um total de 4 tampas para cada animal. Para dar continuidade ao exame com uma lupa, foram avaliados os seguintes parâmetros: forma, cor, textura da superfície de corte, presença ou ausência de extrusões de implante, exsudados e consistência física.

3.4.5 Preparo do material para estudo histomorfométrico e imunohistoquímico

Seguiu-se a inclusão dessas calotas em parafina, obedecendo aos passos preconizados na técnica histológica. Os blocos de parafina foram seccionados em 32 cortes semi-seriados, sendo dois com espessura de 4 μm , seguidos de intervalo de 20 μm , em micrótomo manual de rotação (*Leica Byosystems*[®], modelo RM2125 RTS, São Paulo). Foram empregadas 5 lâminas de vidro por coloração para cada animal, sendo 5 para coloração em hematoxilina-eosina (HE) e 5 para coloração detricrômio de Masson (TM). E outras seis lâminas, tipo *imunoslice*[®] (Easy Path[®], modelo EP-51-30185, São Paulo), destinadas para imunohistoquímica e imunofluorescência, cada qual recebendo dois cortes sequenciais.

Após segregação, as lâminas foram colocadas em estufa de Pasteur a 60°C, por 20 min, para secagem e adesão completa dos cortes à lâmina. Após resfriamento, procedeu-se a três banhos de xilol para desparafinização por 5 min e hidratação em concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80%, 70%) por 3 min cada. A hidratação das lâminas destinadas à histomorfometria foi completada por lavagem em água destilada, mas, para as lâminas destinadas à imunohistoquímica, empregou-se solução de PBS por 10 min, à temperatura ambiente.

3.4.6 Métodos histoquímicos

No final do exame macroscópico, as bulbos oculares foram lavadas em água destilada, colocadas em etanol a 70% e processadas por técnicas histológicas clássicas com inclusão em parafina. O microtomia foi realizada em cortes semi seriais de 5 micrômetros e os cortes teciduais corados para análise e documentação fotográfica sob microscopia de luz, com luz branca. Além dahematoxilina-eosina (HE) , foram utilizados procedimentos de colorações especiais clássicas, tais como: do Tricrômio de Masson (TM) com e sem azul anilina, tricromo Gomory (TG), Picrosirius Sirius Red (PSR), ácido periódico de Schiff (PAS), Weigert, Verhoeff, Van Gienson (VG).^{84,85}

Para análise histológica qualitativa, utilizou-se um microscópio ótico Olympus BX53 com uma câmera digital de DP71 com aumento de 200X e 400X, No caso do Picro Sirius vermelho, a análise foi realizada também sob luz polarizada. No sentido de analisar e caracterizar os tipos celulares e intensidade dos infiltrados mononucleares (linfócitos e plasmócitos), polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, células gigantes multinucleadas, angiogênese e deposição de fibras colágenas e elásticas e outras na intimidade do implante.

As córneas foram examinadas por edema, infiltração celular, persistência do endotélio e neovascularização. Exames foram conduzidos também em buscas de sinais histológicos de necrose, calcificação, hemorragia, restos de bactérias, restos de sutura, extrusão do implante e persistência do implante natural sem celularidade ou vascularização. A população de células totais, células gigantes multinucleadas, a fibrogenese e angiogênese, foram variáveis qualificadas e quantificadas.

A presença ou a ausência dessas variáveis foi registrada em uma planilha construída especificamente para esta finalidade.

3.4.7 Histomorfometria das preparações

Para análise histomorfométrica, procedeu-se à coloração, com hematoxilina-eosina de cinco lâminas com material de cada coelho. Assim sendo, foram quantificadas a densidade de superfície (Sv) de vasos sanguíneos⁸⁶, população celular em geral e células multinucleadas gigantes (CMG).⁸⁷ Outras cinco lâminas foram submetidas à coloração tricrômica de Masson modificada pela retirada da hematoxilina, com o objetivo de avaliar a densidade de fibras colágenas depositadas. Em todo o estudo, cada lâmina continha duas preparações histológicas de uma mesma sequência, escolhidas aleatoriamente, de tal sorte que, havendo imperfeições na primeira, a outra poderia ser utilizada para o estudo. As micrografias foram capturadas com o sistema Zeiss® (modelo AXIO, Oberkochen, Alemanha).

3.4.7.1 Quantificação da densidade de superfície (Sv) de vasos, população celular em geral e células multinucleadas gigantes (CMG)

Foram escolhidos aleatoriamente cinco preparações histológicas por animal e em cada um deles foram colhidas cinco (05) fotomicrografias de campos periféricos distintos, sob o aumento de 100X, capturando-se um total de vinte e cinco fotomicrografias por cada animal, isto é, setenta e cinco fotos por grupo. A densidade de superfície (Sv) de vasos sanguíneos, da população celular em geral e de células multinucleadas gigantes representaram o volume relativo que essas estruturas ocupavam no tecido. A Sv foi calculada usando um sistema de grade teste M42, projetada na imagem por meio do programa *Image J*⁸⁸, respeitando a fórmula $Sv = Pp/Pt$, na qual Sv é a densidade de superfície, Pp é o resultado da contagem dos pontos e Pt é o número de pontos do sistema de grade-teste utilizado.⁸⁸ Os resultados de Sv foram expressos em porcentagem. As micrografias foram capturadas em aumento de 100X.

3.4.7.2 Quantificação de colágeno

Para análise morfométrica da densidade de superfície do colágeno, as fotomicrografias foram coradas por técnica de Masson Modificada (sem a utilização da hematoxilina) para não interferir no padrão de cor do colágeno e capturadas em aumento de 200X, procedendo-se à digitalização e envio para o programa *Image Pró-plus 4.5*[®] (*Media Cybernetics, Silver Spring, EUA*). As áreas de colágeno foram selecionadas por meio da distribuição de cor, como parâmetro discriminante. Após a definição do intervalo de cor, pelo método tentativa-erro, foi selecionada a área em azul que representava a quantidade de colágeno em cada campo. Em seguida, foi aplicada ao próprio programa *Image Pró-plus 4.5*[®] a máscara com a qual se obtiveram a área e a porcentagem de colágeno.^{86,89}

Todas as fotomicrografias foram capturadas com o sistema *Zeiss*[®] (modelo *AXIO, Oberkochen, Alemanha*).

3.4.8 Métodos imunohistoquímicos

Para identificar a presença e a localização específica dos tipos de colágenos nos grupos estudados, empregaram-se recuperação antigênica enzimática, eliminação da peroxidase endógena, bloqueio de antígenos inespecíficos e marcação imunohistoquímica.

A análise fibrovascular foi realizada com a identificação da presença e a localização específica dos tipos de colágenos, bem como de vasos sanguíneos. Para tanto, cortes histológicos foram imunomarcados com anticorpos anti-colágeno tipo I (*Ab6308 mouse monoclonal*, Abcam® Lote 796041, diluição 1:100), anti-colágeno tipo III (*Ab 6310 mouse monoclonal*, Abcam® Lote 724022, diluição 1:300). Anti-CD31 (*Ab24590 mouse monoclonal* Abcam® Lote 8065433 diluições 1:100).

Para recuperação antigênica, utilizou-se solução de tripsina (0,01 g de tripsina + 0,01 g de cloreto de cálcio + 10 mL de água destilada) em câmara úmida, a 37°C por 30 minutos, e lavagem em três banhos de PBS por 2 min. A eliminação da peroxidase endógena foi feita em solução alcoólica de peróxido de hidrogênio (180 mL de metanol + 20 mL de peróxido de hidrogênio a 20%) por 20 min, em temperatura ambiente, protegida da luz, seguida de lavagem em três banhos com PBS, por 2 min cada. Para bloqueio de antígenos inespecíficos do tecido, empregou-se solução de leite desnatado diluído em PBS a 10%, por 30 min, em temperatura ambiente.

Na fase de marcação de colágenos, foram empregados controle positivo, teste e controle negativo. Para marcação do controle positivo, localizado na região periescleral da cápsula de Tenon dos bulbos, incubou-se uma lâmina de cada grupo com o reagente óAôpor 15 min a 36°C, com posterior incubação com 50 µL do anticorpo primário (1:50 *Antimouse IgG goat*) em cada corte, por 60 min em câmara úmida a 36°C. No controle negativo, empregou-se a mesma técnica, porém sem incubação com anticorpo primário.

Nas lâminas teste, o anticorpo 1[COL] (*Ab6308 mouse monoclonal*, Abcam® Lote 796041), diluído em solução tampão PBS na proporção 1:100 microlitros, foi usado para marcação de colágeno do tipo I. O anticorpo: FH-7A

(Ab 6310 *mouse monoclonal*, Abcam[®] Lote 724022), diluído em solução tampão PBS na proporção de 1:300 microlitros, foi o marcador do colágeno do tipo III.

Após lavagens em PBS, todas as lâminas (controles e teste) foram incubadas com o anticorpo secundário em câmara úmida, por 20 min a 36°C, seguindo lavagens em PBS e incubação com o reagente ÓC por 15 min, a 36°C, e lavagens em PBS.

A revelação do complexo antígeno-anticorpo foi realizada com solução de diaminobenzidina (DAB, *Histostar plus*[®], *Invitrogen*[®]), por 2 min. Para coloração nuclear de contraste, utilizou-se hematoxilina de Harris (diluída a 50% em água destilada), por 4 min. As preparações foram desidratadas em soluções crescentes de álcool de 50% a 100%, diafanizadas em dois banhos de xilol e montadas com resina sintética específica, sobreposta com lamínula.

3.4.8.1 Imunofluorescência indireta

O colágeno tipo I e III foi também imunomarcado pela técnica de imunofluorescência indireta. Para tanto, o mesmo anticorpo primário, *mouse monoclonal to collagen I* (Abcam, número do catálogo AB6308, Cambridge, MA, U.S.A) foi usado em concentração 1:50. Foram utilizados bloqueios para grupamentos aldeídicos com soluções de cloreto de amônio 50 mM e glicina à 2% por 30 minutos cada. Após sucessivas lavagens com PBS pH 8.0, foram realizados bloqueios para sítios inespecíficos com a utilização de PBS albumina sérica bovina (BSA) 3% e leite desnatado a 10%. O anticorpo primário foi incubado overnight a 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados em banhos sucessivos de PBS pH 8.0. Posteriormente foi realizado o bloqueio com PBS BSA 3 % por 15 minutos, retirado sem lavagem prévia e incubado com o anticorpo secundário fluorescente *Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG* (Invitrogen, número de catálogo A-11001 Camarillo, CA, E.U.A) na concentração 1:100 por 1 hora em temperatura ambiente, logo após foram realizadas 3 banhos de 5 min em PBS pH 8.0, e para evidenciar o núcleos das células foi utilizado 4',6-diamidino-2-phenylindole, *dihydrochloride* (DAPI) (Invitrogen, número do catálogo D1306, Camarillo, CA, E.U.A) por 15 min, novamente o material

foi lavado com 3 banhos de 5 min de H₂O destilada. Os cortes foram montados utilizando o *Slowfade antifade kit* (Invitrogen, número de catálogo S2828, Camarillo, CA, E.U.A) e visualizados no microscópio de epiiluminação com lâmpada fluorescente (Olympus BX51, Tóquio, Japão) com câmera digital acoplada (Olympus DP72, Tóquio, Japão).

3.4.9 Métodos estatísticos

A análise estatística dos dados foi realizada considerando duas situações:

- a) MÉDIA DOS CAMPOS POR ANIMAL (n = 3 animais por grupo);
- b) MÉDIAS DAS LÂMINAS (n = 15 lâminas por grupo).

Os dados foram digitados na planilha Excel[®] da plataforma Windows, e analisados com o programa de cálculos estatísticos IBM/Statistical Package for Social Science (SPSS), na versão 21.0.4 e analisados descritivamente por média, desvio padrão, coeficiente de variação, e, inferencialmente, pelo teste Kruskal-Wallis com comparações múltiplas do referido teste ao nível de significância de 5%. A escolha do teste foi feita em função do número de animais em cada grupo.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO COM RESULTADOS PUBLICADO NA LÍNGUA INGLESA NOS ARQUIVOS BRASILEIROS DE OFTALMOLOGIA

Artigo Original | *Original Article*

Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes: experimental model in rabbits

Uso de um biopolímero na forma gel para o tratamento de olhos eviscerados: modelo experimental em coelhos

Francisco de Assis Cordeiro-Barbosa¹, José Lamartine de Andrade Aguiar¹, Mariana Montenegro de Melo Liraz, Nicodemos Teles de Pontes Filho², Sidcley Bernardino-Araújo³

RESUMO

Objetivos: Avaliar histologicamente o processo de integração do gel da celulose produzida pela Zoogloe asp implantado em olhos eviscerados de coelhos. **Métodos:** Estudo experimental utilizando 36 olhos de 18 coelhos. Todos eles tiveram seus olhos direitos eviscerados. A bolsa escleral foi suturada e preenchida com biopolímero da cana de açúcar, no estado gel. Todos os animais foram examinados clinicamente, sob biomicroscopia, até o dia de seus sacrifícios e enucleações que aconteceram no 7º, 30º, 60º, 90º, 120º e 240º dia. Os bulbos obtidos, inclusive os esquerdos, considerados controles, foram encaminhados para estudo histopatológicos de macroscopia e microscopia óptica. As colorações pela hematoxilina-eosina, tricômio de Masson (com anilina), tricômio de Gomori, Van Gienson e Picrosirius red e ácido periódico de Schiff (PAS) foram usadas. **Resultados:** Durante o experimento não foram observados sinais clínicos de infecção, alergias, intoxicação ou extrusão. As córneas apresentavam-se relativamente preservadas. Exame macroscópico revelou uma diminuição de aproximadamente 8% no volume dos bulbos nos quais o biopolímero foi implantado. O corte do saco escleral mostrou um conteúdo sólido, compacto, elástico, resistente à tração, com superfície lisa e brancacenta. Não foram observados sinais de

necrose, ou liquefação. O tecido epiescleral estava algo hipertrofiado. As preparações histológicas estudadas, nas diversas colorações, revelaram uma infiltração linfomononuclear inicial, substituída posteriormente por uma resposta fibroblástica e proliferação de histiócitos com formação de células multinucleadas gigantes. Foram também encontrados poucos polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos. A partir do 30º dia houve proliferação vascular e deposição de calágeno em todos os espécimes estudados, embora, no 240º dia do experimento, a resposta inflamatória crônica, a neovascularização e a deposição do colágeno não tinham ainda atingido o centro do implante. **Conclusão:** Neste modelo, o gel da celulose produzido pela *Zoogloea* sp, mostrou-se biocompatível e integrado às órbitas. Estudos morfométrico, imuno-histoquímico e de biodegradabilidade devem ser realizados futuramente. Descritores: Enucleação ocular; Evisceração do olho; Bioprótese; Olho artificial; Saccharum; Implantes orbitários; Biopolímeros; Modelos animais; Coelhos

Purpose: To evaluate histologically the integration process of cellulose gel produced by *Zoogloea* sp when implanted into rabbits' eviscerated eyes. **Methods:** This experimental study employed 36 eyes of 18 rabbits subjected to evisceration of their right eyes. The sclerocorneal bag was sutured and filled with biopolymer from sugar cane in the gel state. All animals were clinically examined by biomicroscopy until the day of their sacrifice which occurred on the 7º, 30º, 60º, 90º, 120º, or 240º day. The eyeballs obtained, including the left eyes considered controls were sent for histopathological study by optical macroscopy and microscopy. Tissue staining techniques used included hematoxylin-eosin, Masson trichrome (with aniline), Gomori trichrome, Van Gienson, Picrosirius red, and periodic acid-Schiff (PAS). **Results:** No clinical signs of infection, allergy, toxicity, or extrusion were observed throughout the experiment. The corneas were relatively preserved. Macroscopic examination revealed a decrease of ~ 8% in the volume of the bulbs implanted with the biopolymer. After cutting, the sclerocorneal bag was solid, compact, elastic, and resistant to traction, with a smooth and whitish surface, and showed no signs of necrosis or liquefaction. The episcleral tissues were somewhat hypertrophied. The

histological preparations studied in different colors revealed an initial lymphoplasmacytic infiltration, replaced by a fibroblastic response and proliferation of histiocytes, along with formation of giant cells. Few polymorphonuclearneutrophils and eosinophils were also found. Neovascularization and collagen deposition were present in all animals starting from day 30^o; although on the 240^o day of the experiment the chronic inflammatory response, neovascularization and collagen deposition had not yet reached the center of the implant. **Conclusion:** In this model, the cellulose gel produced by *Zoogloea* sp proved to be biocompatible and integrated into the orbits. Morphometric, immunohistochemical and biodegradability studies should be performed in the future. Keywords: Eye enucleation; Eye evisceration; Bioprosthesis; Eye, artificial; Saccharum; Orbital implants; Biopolymers; Models, animal; Rabbits

INTRODUÇÃO

As cirurgias de evisceração, nucleação e tratamento reparativo da cavidade onofálmica permanecem sendo procedimentos traumatizantes e desafiantes do ponto de vista psicológico, tanto para o paciente e para o oftalmologista. Hoje, em todo o mundo, o número de pacientes que têm sido formalmente indicado para esses tipos de cirurgias continua elevado^(1,2). Além disso, o sentimento de perda do globo ocular, a evisceração ou Enucleação predispõe o indivíduo a defeitos estéticos tais como Enoftalmia, aprofundamento do sulco superior da pálpebra, ptose, transferência incompleta do movimento para a prótese, redução do fórnice inferior e flacidez da pálpebra inferior⁽³⁾.

Na tentativa de reduzir estes resultados decepcionantes, a biotecnologia tem proporcionado na oftalmologia uma gama de implantes e próteses, cada vez mais aprimoradas para a plasticidade funcional, biocompatibilidade e integrado ao hospedeiro^(4,5).

Existem vários tipos de implantes utilizados para substituição do conteúdo orbital de cavidades anophthalmica, no entanto, estes implantes podem ser distribuídos em dois principais grupos. Esses grupos consistem os implantes não integráveis, inertes, como vidro e polimetilmetacrilato e os implantes integrados, que têm sido

utilizados desde a década de 1980 e incluem esferas de hidroxiapatita e polietileno poroso de óxido de alumínio⁽⁶⁻⁹⁾.

Além dos problemas estéticos, qualquer implante orbital existente, integrado ou não, pode submeter ao paciente a extrusão, infecção e deiscência da conjuntiva. Existem várias causas para estas complicações. Uma delas poderia ser o fato de que os implantes se movem junto com o conteúdo orbital, e as próteses externas podem causar traumas repetidos na superfície da conjuntiva. Portanto, a reconstrução da cavidade anoftálmica com um polímero integrado com uma superfície suave e macia poderia ajudar a diminuir a frequência de implante orbital à extrusão^(4,10-12).

Na indústria médica e farmacêutica a celulose está sendo testada como um substituto para os vasos sanguíneos, como envelope para os nervos periféricos, crescimento de tecidos cartilaginosos, substrato de cultura de células, curativos biológicos para queimaduras e para uso na fabricação de próteses de numerosos outros dispositivos em oftalmologia veterinária⁽¹³⁻¹⁹⁾.

Um polímero de celulose, obtido por síntese bacteriana de melaço de cana de açúcar, tem sido estudado no laboratório de microbiologia Industrial em Carpina, Estação Experimental de cana / Universidade Rural de Pernambuco, desde 1990. É um exopolissacarídeo produzido a partir da bactéria *Zooglea sp*, isolada no departamento de antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Este polímero está sendo usado para o desenvolvimento de próteses com aplicações em diferentes subáreas da cirurgia⁽²⁰⁾.

Em seu estado puro, o polímero tem baixa toxicidade elevada biocompatibilidade, elasticidade, resistência à tração, flexibilidade, e ele ainda pode ser modelado de maneiras diferentes, incluindo como um gel, cumprindo assim os requisitos necessários para a fabricação de implantes biológicos^(21,22).

O gel de biopolímero celulósico é obtido por fermentação bacteriana de *Zooglea sp* foi utilizado com sucesso na correção experimental de refluxo vesicoureteral em cães; no entanto, os tipos de reações celulares que caracterizam a integração do implante não foram estudados em detalhe⁽²³⁾. Um implante orbital consistindo de gel de polietileno poroso foi testado sem sucesso por Ferrazand et al⁽²⁴⁾. O gel de polietileno mostrou enorme inchaço quando em contacto com os tecidos orbitais.

Estudos histopatológicos em casos onde polietileno poroso e hidroxiapatita foram usados como os implantes de Oftalmologia integrados inicialmente revelam uma reação inflamatória crônica na linha de fronteira entre o implante e o tecido do hospedeiro. Histiócitos, fibroblástico e proliferação de neovasos ocorreram juntamente com a formação de células multinucleadas do tipo corpo estranho. Finalmente, a deposição de fibras colágenas indica reparação e integração do implante para hospedeiro⁽²⁵⁻²⁷⁾.

Neste estudo, um modelo experimental utilizando coelhos propõe-se avaliar, histologicamente, o processo de integração de um implante artificial de gel de celulose, produzido por *Zoogloea sp*, usados para restaurar olhos eviscerados.

MÉTODOS

Este estudo empregou 36 olhos de 18 coelhos, saudável, jovem, Califórnia mestiços de. Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos de 3 animais por grupo. Durante o experimento, todos os animais foram submetidos a evisceração de seu olho direito, de acordo com uma técnica cirúrgica recomendada em cirurgia oftálmica; no entanto, a córnea foi preservada. Os olhos esquerdos não foram manipulados e serviu como clínicos e anatômicos patológicos controles.

O saco de esclerocorneal foi suturado com Vicryl® 6.0 em pontos contínuos. Para facilitar os exames pós-operatórios, a córnea não sofreu revestimento conjuntival. Após o fechamento, a cavidade sclerocorneal foi preenchida com ~ 4,0 mL de gel de biopolímero de cana de açúcar, previamente esterilizado por irradiação gama. Nos olhos operados, foi aplicada uma combinação de ciprofloxacina e a dexametasona na forma de uma pomada (Cilodex®), uma vez por dia durante os primeiros sete dias após o experimento. Os animais formaram os grupos de acordo com o dia da sua eutanásia e enucleação dos dos olhos direito e esquerdo assim: Grupo G7 eutanásia no 7º dia da cirurgia de evisceração e reconstrução, G30 no 30º dia e assim sucessivamente nos grupos G60, G90, G120 e finalmente no G240.

Todos os procedimentos médicos e cirúrgicos foram realizados de acordo com um protocolo previamente aprovado pelo Comitê de ética de experimentação animal da UFPE.

ESTUDOS CLÍNICOS

Todos os animais foram submetidos a exame de biomicroscópio do segmento anterior de ambos os olhos com uma lâmpada de fenda. Este exame foi inicialmente realizado a cada 24 horas e após o 7º dia, semanalmente, até o dia do sacrifício. Estes testes foram conduzidos principalmente para observar os seguintes sinais:

Ç Na conjuntiva: edema, hiperemia, quemose, deiscência de ferida cirúrgica, extrusão, secreção, hemorragia purulenta e hipertrofia celular (papilar, folículos e granulomas).

Ç Na córnea: turvação, presença de úlceras, escoriações epiteliais, perfuração do parenquimatosa, turvação endotelial, exudato (leucoma).

ESTUDOS ANATOMOPATOLÓGICOS

Após o sacrifício, todos os animais tiveram os dois olhos enucleados e foram colocados imediatamente em solução de formalina 10% tamponada por um período de 48 horas. Após a fixação completa, os bulbos foram submetidos ao exame macroscópico, realizado em 2 etapas: A primeira fase envolveu medir os diâmetros (tamanhos) de bulbos, direitos e esquerdos, por um paquímetro digital precisão, bem como a descrição da superfície externa dos bulbos, juntamente com os tecidos peri-oculares, usando uma lupa estereotáxica Olympus com uma ampliação de x10.

Na segunda etapa, as lâmpadas foram cortadas em um plano sagital em seus maiores diâmetros formando duas calotas aproximadamente iguais, sempre em pares, direita e esquerda, com um total de 4 tampas para cada animal. Para dar continuidade ao exame com a lupa, foram avaliados os seguintes parâmetros na superfície de corte: forma, cor, textura, presença ou ausência de extrusões de implante, exsudados e consistência física.

No final do exame macroscópico, as calotas foram lavadas em água destilada, colocadas em etanol a 70% e processadas por técnicas histológicas clássicas com impregnação de parafina. Amicrotomia foi realizada em cortes semi seriais de 5 micrômetros e os cortes foram corados para análise e documentação fotográfica sob microscopia de luz branca. No caso do Pricrosírius red, o exame foi feito usando

também luz polarizada. Foram utilizados os seguintes técnicas de coloração: hematoxilina-eosina, do tricromo Masson (com anilina azul), tricromo Gomory, Van Gienson, Picrosírius vermelho e ácido periódico-Schiff (PAS).

Para análise histológica qualitativa, utilizou-se um microscópio ótico Olympus BX53 com uma câmera digital de DP71 com aumento de 400X, para identificação de infiltrados mononucleares (linfócitos e plasmócitos), polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, células gigantes multinucleadas, neovasos, fibroblastos, septo vascular e deposição de fibras colágenas na intimidade do implante. Nas córneas foram examinadas: edema, infiltração celular, persistência do endotélio e neovascularização ou pannus. Pesquisou-se também por sinais histológicos de necrose, calcificação, hemorragia, restos de bactérias, restos de sutura, extrusão do implante e persistência do implante natural sem celularidade ou vascularização. A presença de células gigantes multinucleadas e neovasos foram ordenadas de acordo com o número de eventos por campo ao microscópico.

A presença ou a ausência dessas variáveis foram gravadas em uma planilha construída especificamente para esta finalidade.

RESULTADOS

Os exames clínicos realizados nos olhos eviscerados e recomposto com biopolímeros mostrou ligeira ou moderada hiperemia conjuntival com secreção de serobloody nos primeiros dias do experimento, que desapareceu completamente no 7º dia. Não foi observado sinais clínicos de infecção, alergias, toxicidade ou extrusão durante o experimento (Figura 1). As córneas em todos os animais permaneceram claras e transparentes durante os primeiros 90 dias do experimento. Exame ao biomicroscópio com lâmpada de fenda não revelou nenhuma evidência de precipitados, perfuração da córnea ou extrusão do implante acima da conjuntiva em qualquer um dos animais. Os olhos esquerdos, considerados controles, não revelaram nenhuma alteração durante o experimento (Figura 1).

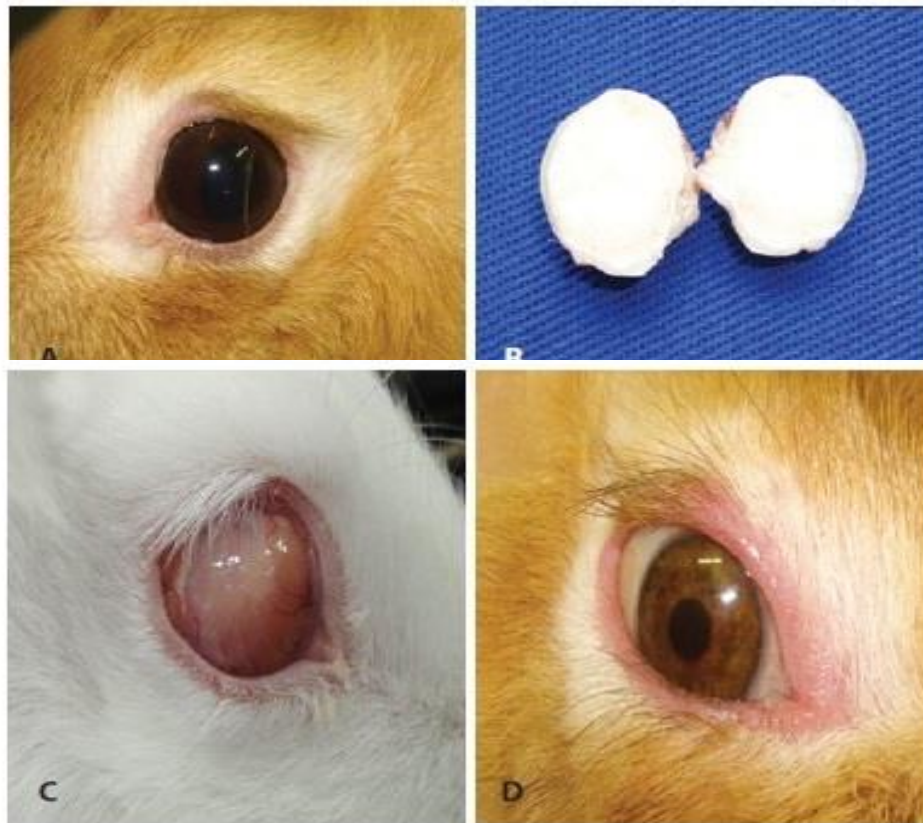


Figure 1. A) Left eye (control). B) Macroscopic appearance of the implanted eyeball showing compact substance, whitish, solid, and surrounded by an elastic sclera with normal color and consistency. C) Orbital aspect of an albino animal that received the implant Gel 210 days earlier. Note that vessels within the implant through the cornea are still partially transparent. D) Final appearance of a human prosthesis on the implant, animal on day 210 of the experiment.

Exames macroscópicos de olhos esquerdos (controles), realizados após 48 horas de fixação em formol, revelaram diâmetro médio axial de 17,16 mm, medida ao diâmetro maior, ou seja, partir do ápice da córnea com a esclera posterior na inserção do nervo óptico. As córneas e outros tecidos oculares não apresentaram anormalidades. Os bulbos certo, aqueles evisceradas e preenchidos por gel de celulose, apresentou uma redução em seus diâmetros ântero-posterior, medindo uma média de 16,10 milímetros. As córneas manteve-se relativamente claras, e a esclera com coloração e consistência sem alterações. Os tecidos episcleral estava ligeiramente hipertrofiada e acastanhada. Aos cortes, a superfície do conteúdo do era compacta, esbranquiçada, sólida e um pouco elástico ao toque pelas

extremidades. Não havia sinais de liquefação de conteúdo foram observadas (Figura 1. b). Em alguns bulbos, pequenas linhas escuras e descontinuas foram observadas entre a esclera e os biopolímeros.

Exames microscópicos

A análise histológica qualitativa (Figura 2) revelou infiltrados monomorfonucleares (linfócitos e plasmócitos) (Figura 3) nos animais sacrificados a partir do grupo G30. O infiltrado de polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) estava presente desde o início do experimento, mas parecia ser baixa ou mesmo ausente em alguns animais após 60 dias. Deposição de fibras colágenas, fibroblastos e células gigantes multinucleadas (Figura 3D) estavam presentes em todos os animais a partir de dia 30 (Figura 3B). Os vasos na intimidade do implante (Figura 3), edema da córnea e infiltração celular já tinham aparecido nos animais sacrificados no 7º dia. Presença de coleções de cálcio ocorreu em 8 animais, enquanto necrose ocorreu em apenas em animal 60.1. Sinais sugestivos de restos bacterianos estavam presentes apenas no animal 7.1. Nas preparações de vários animais identificou-se restos de suturas e pequenas extrusões de gel. No 240º dia do experimento, a resposta inflamatória era crônica, no entanto a neovascularização, a deposição de colágeno ainda não tinha chegado do ao centro do implante. A monocamada de células endoteliais da córnea (Figura 3A) era pouco visível nos animais 240.1 e 240.2.

ANIMAL GROUPS	LYMPH / PLASMA	NEUTROPHIL	EOSINOPHILS	GIANTS CELL/FIELD	VASCULAR SEPTO	VESSELS/FIELD	FIBROBLASTS	FIBROSIS	CORNEAL EDEMA
7.1	ABSENT	PRESENT	PRESENT	0,00	PRESENT	5.8	ABSENT	ABSENT	PRESENT
7.2	ABSENT	PRESENT	PRESENT	0.00	ABSENT	0	ABSENT	ABSENT	PRESENT
7.3	ABSENT	PRESENT	PRESENT	0.00	PRESENT	9.8	ABSENT	ABSENT	PRESENT
30.1	PRESENT	PRESENT	PRESENT	1,10	ABSENT	3.5	PRESENT	PRESENT	PRESENT
30.2	PRESENT	PRESENT	PRESENT	1,30	ABSENT	4.2	PRESENT	PRESENT	PRESENT
30.3	PRESENT	PRESENT	PRESENT	1,30	ABSENT	4.2	PRESENT	PRESENT	PRESENT
60.1	PRESENT	PRESENT	PRESENT	9,80	ABSENT	4.1	PRESENT	PRESENT	PRESENT
60.2	PRESENT	PRESENT	PRESENT	7,30	ABSENT	4.6	PRESENT	PRESENT	PRESENT
60.3	PRESENT	ABSENT	PRESENT	1,90	ABSENT	5.0	PRESENT	PRESENT	PRESENT
90.1	PRESENT	ABSENT	PRESENT	10,70	PRESENT	3.7	PRESENT	PRESENT	ABSENT
90.2	PRESENT	ABSENT	PRESENT	8,20	ABSENT	2.0	PRESENT	PRESENT	ABSENT
90.3	PRESENT	ABSENT	PRESENT	12,10	ABSENT	3.0	PRESENT	PRESENT	ABSENT
120.1	PRESENT	PRESENT	PRESENT	6,30	PRESENT	5.1	PRESENT	PRESENT	ABSENT
120.2	PRESENT	ABSENT	PRESENT	7,20	ABSENT	2.8	PRESENT	PRESENT	ABSENT
120.3	PRESENT	ABSENT	PRESENT	10,70	ABSENT	3.9	PRESENT	PRESENT	PRESENT
240.1	PRESENT	PRESENT	PRESENT	11,50	PRESENT	3.0	PRESENT	PRESENT	ABSENT
240.2	PRESENT	PRESENT	ABSENT	23,80	PRESENT	3.1	PRESENT	PRESENT	ABSENT
240.3	PRESENT	ABSENT	ABSENT	23,80	PRESENT	9.8	PRESENT	PRESENT	PRESENT
ANIMAL GROUPS	CORNEAL INFILTRATES	CORNEAL NEOVESSEL	CALCIFICATION	NECROSIS	BACTERIAL REMAINS	SUTURE REMAINS	MICRO EXTRUSION	POLIMER WITHOUT NEOVESSELS	CORNEAL ENDOTHELIUM
7.1	PRESENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT	PRESENT	ABSENT
7.2	PRESENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	ABSENT
7.3	PRESENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT
30.1	PRESENT	PRESENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	ABSENT
30.2	PRESENT	PRESENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT
30.3	PRESENT	PRESENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT
60.1	PRESENT	PRESENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT	PRESENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT
60.2	PRESENT	PRESENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT
60.3	PRESENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT
90.1	ABSENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	ABSENT
90.2	PRESENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	ABSENT
90.3	ABSENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	ABSENT	PRESENT	ABSENT
120.1	ABSENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT
120.2	ABSENT	PRESENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT
120.3	ABSENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT
240.1	ABSENT	PRESENT	PRESENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	PRESENT	PRESENT	PRESENT
240.2	ABSENT	PRESENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	PRESENT
240.3	PRESENT	PRESENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	ABSENT	PRESENT	ABSENT

Figure 2. The histological study was conducted to identify cells involved in the phenomena of infections, allergies or inflammation (acute or chronic).

O estudo histológico foi realizado para identificar as células envolvidas nos fenômenos de infecções, alergias ou inflamação (aguda ou crônica).

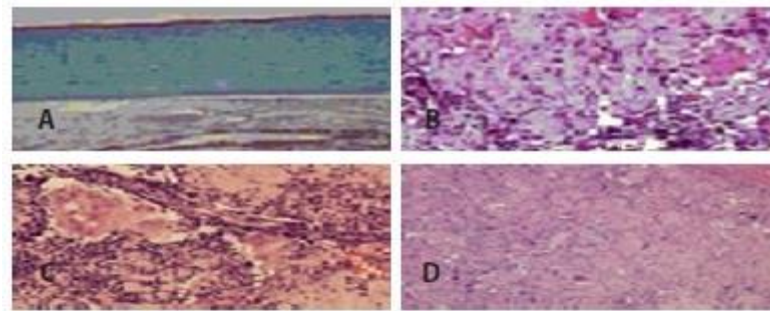


Figure 3. A) Masson trichrome (x100). Biopolymer-cornea Interface: corneal epithelium, membrane of Bowman, stroma, and Descemet, relatively preserved. In some points, we see remains of the endothelial monolayer. Deposit of collagen fibers and neovascularization of the implant surface. B) Masson trichrome- x200: Interior of the implanted gel: lymphocytic infiltration, multinucleated giant cells, neovessels, and collagen deposition represented by tones of blue aniline. C) Hematoxylin-eosin (HEx200). Interior of the implanted substance: infiltrated lymphoplasmacyte that passes through the scleral tissue and reaches the interior. Histiocytes arranged in multinucleated giant cells forming a granuloma. Presence of vacuoles with biopolymer in the cytoplasm of these cells. Also observe indicative points of neovascularization. D) Hematoxylin-eosin (HEx100). Sclera-polymer interface: Tissue showing congestion and edema. Scleras showing their characteristic longitudinal fibers. Presence of numerous multinucleated cells.

DISCUSSÃO

No exame clínico (Figura 1 C), a ausência de edema, hiperemia conjuntival, proliferação papilar ou folicular, secreções (mucopurulenta e bloodymucus), perfuração ou opacificação corneal nos olhos que receberam o polímero sugere que não havia nenhuma doença clinicamente aguda com a participação de bactérias de alta virulência, como ocorre na extrusão de implantes sólido ⁽²⁷⁾. Também não havia sinais de processo agudo, alérgico ou tóxico, que teria sugerido uma falta de biocompatibilidade. Estudos de citotoxicidade oferecem suporte a essas conclusões, porque eles mostraram o biopolímero de cana de açúcar possui uma biocompatibilidade semelhante de politetrafluoretileno expandido (PTFE) e polipropileno (Prolene[®]), que são amplamente usadas em geral e oftalmológicas cirurgias. ⁽²¹⁾

O estudo macroscópico demonstrou que o implante diminuiu ~ 8% do seu volume original. Porque o gel de polímero em seu estado natural é rico em água ⁽²⁰⁾, e os tecidos escleral e periocular tem uma maior concentração de água, esperava-se encontrar uma diminuição do volume do implante devido a fuga de solvente, seguindo o gradiente de concentração. Em humanos, esta redução seria favorável porque isso corresponderia ao volume adicional da prótese (Figura 1). Por outro

lado, nos estudos de engenharia de tecido que utilizam celulose produzida por bactérias, podem ser misturados com várias substâncias que alteram suas taxas de desidratação, biocompatibilidade, biodegradabilidade ou características biomecânicas. Portanto, pode exercer controle sobre o volume final de um implante de gel.

A não-liquefacção de seu implante em todos os animais incluindo o saco de esclerocorneal, suporta o argumento de que não havia nenhuma infecção ou ação proteolítica na esclera, córnea ou em seu conteúdo (figura 1B). No entanto, a hipertrofia do tecido episcleral indica que a inflamação induzida pelo implante foi além dos limites do seu continente, atingiu outros tecidos. Isso é semelhante ao que pode acontecer no estudos histopatológicos experimentais usando outros órgãos⁽¹⁹⁾. Em particular, os achados histológicos no presente estudo, mostrando micro-extrusões, inicialmente sugeriram que a sutura do saco sclerocorneal deveria ser tão precisa quanto possível. Na realidade, estas microextrusões explicam as hipertrofias dos tecidos episcleral vistos nos exames macroscópicos. Esses achados não afetou o exame com a lâmpada de fenda porque o vazamento de gel sempre foi contido pelo revestimento da cápsula ocular.

Achados histológicos comprovam os exames clínicos, que o biopolímero implantado não é tóxico e biocompatível⁽²⁸⁾. Houve necrose focal em apenas um animal, e que estava relacionado com restos de material de sutura. Havia hemorragias em amostras histológicas, apenas em animais 7.2 e 7.3, e eles provavelmente estavam relacionados com a técnica de cirurgia. Em alguns animais, houve a presença de calcificação, mas não havia nenhuma relação com áreas de necrose, que exclui as chances de uma calcificação distrófica.

Apesar da evisceração rigorosa, em alguns animais, havia pequenas quantidades de material cristalino e tecido da Úvea. Estudos sobre a patologia da uveíte têm mostrado que os tecidos da Úvea (íris, corpo ciliar e coróide) e o material cristalino, quando traumatizado, podem desencadear uma resposta inflamatória mediada inicialmente por mononuclear linfócitos e células plasmáticas. Esta resposta

é geralmente seguida por uma resposta Histiocítica com a possibilidade de formação de tipo corpo estrangeiro-células gigantes multinucleadas, localizado precisamente com o resto do material em questão ⁽²⁹⁾. É interessante notar, no entanto, que, no presente estudo, a reação inflamatória crônica ocorreu indiscriminadamente em todos os locais estudados em todos os animais, independentemente da presença ou ausência de resíduos da Úvea ou cristalinos. Em estudos histopatológicos usando celulose liofilizado em lesões de nervos periféricos em cães, os pesquisadores observaram a presença de uma reação fibroblástica crônica (tipo corpo estranho com células multinucleadas gigantes), que foi seguida pela deposição de colágeno⁽¹⁹⁾.

No presente estudo, coloração especial (Van Gienson, tricrômio de Masson, Gomory, Picrosirius vermelho e ácido periódico-Schiff (PAS) (Figura 4A, B, C e D) identificou-se uma neovascularização, inflamação crônica fibroplasia, bem como deposição de colágeno em todos os animais a partir do 30º dia. Nos mesmos animais, a presença dessas fibras apareceu a seguir as células gigantes multinucleadas e o neovasos como eles entraram o material implantado. O colágeno não apenas forma uma cápsula murando ao redor do implante, mas também penetra a intimidade do material (Figura 4A). Esta penetração foi bem evidenciada naqueles animais que passaram mais tempo no experimento. Ao observar o neogenesis vascular na preparação de diversos animais durante o experimento, notamos que tinha as mesmas características, começando na periferia e avançando em direção ao centro; Além disso, foi maior nos animais que sobreviveram mais tempo antes do sacrifício. Vários cortes histológicos de diferentes animais mostraram cortes longitudinais desses vasos, formando septos vasculares (Figura 3). Vale ressaltar que mesmo na últimos animais sacrificados no dia 240, o centro do implante não havia sido ocupado por células, vasose por fibras de colágeno. Os fenômenos patológicos descritos acima sustentam a integração do implante ao hospedeiro e foram semelhantes aos fenômenos observados em estudos anteriores, incluindo os revisado por Sami, envolvendo outros materiais e implantes^(4,7,27). Ao usar um implante de polietileno integrado, Ferraz e colegas observados a formação de uma pseudo cápsula em torno desta substância e neovasos, juntamente com tecidos fibrovasculares preenchendo os espaços entre os grãos do material⁽²⁶⁾. Em

microscopia de luz branca, fibras compostas de tiposcolágeno foram identificados sendo acidófilo e cor de rosa com eosina, verde com Gomori tricromo, azul com Masson (com anilina), magenta com van Gienson e vermelho com vermelho Sirius (Figura 4). No entanto, fibras reticulares, formadas principalmente de colágeno tipo III, são observadas como finas linhas pretas usando o método do PAS. Por outro lado, quando nas preparações coloridas com Sirius vermelho são vistos por microscopia de luz polarizada, devido a birrefringência das fibras colágenas, cores de comprimentos de onda diferentes podem ser identificadas que variam de vermelho para verde, passando por laranja e amarelo. Os tons mais vermelhos representam o colágeno maduro (tipo I) com fibras mais grossas, enquanto os tons de verdes e amarelo surgeremum colágeno imaturo fino ou fibras reticulares (tipo III)⁽³⁰⁾. De acordo com as descrições acima na literatura, neste experimento, em microscopia de luz polarizada das preparações coloridas com Sirius vermelho mostrou tons coloridos contra um fundo escuro; especialmente em animais sacrificaram em ou após o dia 30. Estas imagens de cor, variando do vermelho ao verde, passando pelo amarelo e laranja, sugerem fortemente a presença de depósitos de fibras de colágeno. Estudos imuno-histoquímicos futuro irão identificar todos os tipos de colágenos depositados durante a implantação de um implante de gel de biopolímero de cana-de-açúcar. Tendo em vista estes resultados, é evidente que a deposição de colágeno após uma resposta fibroblástica e evascular representa um excelente sinal de reparação e remodelamento da matriz extracelular, bem como da biointegração do implate.

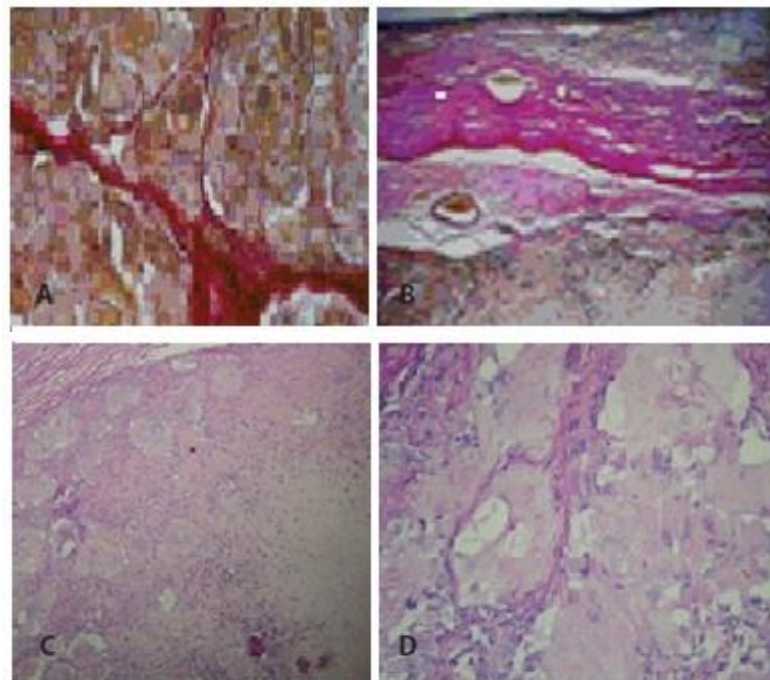


Figure 4. A) Colored with Picrosirius red (x200) under white light showing the intimacy of the implant where the cytoplasm of multinucleated cells display their large vacuoles containing biopolymers. Note neovessels and collagen fibers invading the interior of the implant. B) Van Gienson: x100: Histopathology of the gel on the interface with the cornea, showing corneal edema and deep stromal neovascularization. Deposit of collagen fibers between Descemet membrane and the biopolymer. Neovascularization of the periphery of the gel implant. Cell nuclei are dark, indistinct, and interspersed with the implanted material, as well as the cytoplasm of multinucleated cells. C) Histology aspect of the biopolymer gel implant showing deposition of collagen material between multinucleated giant cells with the sclera. Note greater histiocytic and fibroblastic activity in the periphery and center of the implant: periodic acid-Schiff (PAS) x100. D) Histopathological aspect of the biopolymer gel implant colored with PAS, to a greater increase (x200), showing in particular the intense magenta coloration, suggesting the presence of collagen material.

CONCLUSÃO

Neste modelo experimental, o gel de celulose produzido por *Zoogloea sp* de melaço de cana de açúcar foi mostrado para ser integrado, biocompatível e atóxico para as órbitas de coelhos.

Novos estudos experimentais, especialmente morfométricos, imuno-histoquímica e biodegradabilidade devem ser conduzidos usando o mesmo material, não só para consolidar os resultados acima, mas também acabar ou cantar sua utilização em outros animais e também em humanos.

REFERÊNCIAS

1. Amaro TA, Yazigi L, Erwenne C. Aspectos psicológicos e qualidade de vida em pacientes com melanoma uveal durante o processo de tratamento por remoção do bulbo ocular. *Arq Bras Oftalmol.* 2006;69(6):889-94.
2. Rasmussen ML, Prause JU, Johnson M, Kamper-Jorgensen F, Toft PB. Review of 345 eye amputations carried out in the period 1996-2003, at Rigshospitalet, Denmark. *Acta Ophthalmol.* 2010;88(2):218-21.
3. Takahagi RU, Goncalves F, Schellini SA, Padovani CR. Avaliação quantitativa das dimensões óculo-palpebrais em portadores de cavidade anoftálmica em uso de prótese ocular externa. *Arq Bras Oftalmol.* 2005;68(4):517-20.
4. Sami D, Young S, Petersen R. Perspective on orbital enucleation implants. *Surv Oph - thalmol.* 2007;52(3):244-65.
5. Araf D, Assae OM, Brito RV, Aquino Jr G, Silva TA. Miscellaneous orbital implant for anophthalmic cavity reconstruction surgery: case report. *Arq Bras Oftalmol.* 2010; 73(1):81-3.
6. Perry AC. Integrated orbital implants. *Adv Ophthalmic Plast Reconstruct Surg.* 1988; 8:75-81.
7. Rubin PA, Popham JK, Bilyk JR, Shore JW. Comparison of fibrovascular ingrowth into hydroxyapatite and porous polyethylene orbital implants. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 1994;10(2):96-103.
8. Yoon JS, Lew H, Kim SJ, Lee SY. Exposure rate of hydroxyapatite orbital implants: A 15-year experience of 802 cases. *Ophthalmology.* 2008;115:566-72.e2. Comment in: *Ophthalmology.* 2008;115(12):2320-1; author reply 2321. *Ophthalmology.* 2008; 115(11):2096; author reply 2096-7.
9. Jordan DR, Gilberg S, Mawn LA. The bioceramic orbital implant: experience with 107 implants. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 2003;19(2):128-35.
10. Schellini SA, Ichida FK, Padovani CR. Extrusão dos implantes em portadores de cavidade anoftálmica. *Arq Bras Oftalmol.* 2007;70(5):752-5.
11. Huang D, Yu Y, Lu R, Yang H, Cai J. A modified evisceration technique with scleral quadrisection and porous polyethylene implantation *Am J Ophthalmol.* 2009;147(5): 924-8.
12. Shoamanesh A, Pang,NK, Oestreicher JH. Complications of orbital implants: a review of 542 patients who have undergone orbital implantation and 275 subsequent peg placements. *Orbit.* 2007;26(3):173-82.
13. Yamanaka S, Ono E, Watanabe K, Kusakabe M, Suzuki Y, inventors; Hollow microbial cellulose, process for preparation thereof, and artificial blood vessel formed of said cellulose. European patent, EP0396344A2. 1990 Nov. 07.
14. Klemm D, Udhardt U, Marsch S, Shumann J, inventor. Method and device for producing shaped microbial cellulose for use as a biomaterial, especially for microsurgery. United State patent US2003/0013163, 2003 16 Jan. Available from: <http://www.delphion.com>
15. Oster GA, Lentz Y, Koehler K, Hoon R, Serafica G, Mormino R, et al. Solvent dehydrated microbially-derived cellulose for in vivo implantation. United State Patent US6599518, 2003 29 Jul.
16. Damien C, Heather AB, Oster GA Wright ES, Serafica G, inventor; Xylos Corportion, assignee. Dura substitute and a process for producing the same.

- United State patent US20050042263A1, 2005 24 Feb. Available from: <http://www.delphion.com>.
17. Brik D. Aplicação de película de celulose em lesões epiteliais da córnea. Estudo experimental comparativo. *Rev Bras Oftalmol*. 1991;50(4):215-20.
 18. Schoenau LS, Pippi NL, Schossier JEV. Avaliação clínica preliminar do fechamento comparativo de incisões corneanas com sutura e Biofill (Película Celulósica). *Ciênc Rural* 1993;23(2):173-7.
 19. Mello LR, Feltrin Y, Selbach R, Macedo JG, Spautz C, Haas LJ. Uso da celulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. *Arq Neuropsiquiatria*. 2001;59(2-B):372-9.
 20. Beedle MP, Kennedy JF, Melo FAD, Lloyd LL, Medeiros VA. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zooglea* sp. *Carbohydr Polym*. 2000; 42(4):375-83.
 21. Castro CM, Aguiar JL, Melo FA, Silva WT, Marques E, Silva DB. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. *Na Fac Med Univ Fed Pernamb*. 2004;49(2):119-23.
 22. Silveira AA, Dantas ML, Almeida YM, Aguiar JL. Estudo biomecânico de membranas de biopolímero da cana de açúcar perfuradas e continuas implantadas no celular subcutâneo da parede abdominal de ratos. *An Fac Med Univ Fed Pernamb*. 2007; 52(1):55-9.
 23. Rangel AE, Aguiar JL, Lima SV, Araújo FC, Vilar FO, Pires JA. A new biomaterial for the treatment of vesicouretral reflux: experimental study. *Int Braz J of Urol*. 2006;32 (Suppl. 2):A184. Apresentado no: XXVIII Congresso de la Confederación Americana de Urologia-CAU, 2006. Recife, Jun. 17 -22.
 24. Ferraz LC, Schellini SA, Wludarski SL, Padovani CR. Implantes de polietileno gel e poroso em cavidade anoftálmica de coelhos. *Arq Brás Oftalmol*. 2006;69(3):304-8.
 25. Tambe K, Pushpoth S, Mudhar HS, Sandramouli S. A histopathologic study of orbital implant vascularization. *Orbit*. 2009;28(1):50-7.
 26. Ferraz LC, Schellini SA, Wludarski SL, Padovani CR, Müller S. Uso de 2-octil-cianoacrilato na reconstrução da cavidade anoftálmica de coelhos. *Arq Bras Oftalmol*. 2007; 70(2):221-4.
 27. Chuo JY, Dolman PJ, Ng TL, Buffam FV, White VA. Clinical and histopathologic review of 18 explanted porous polyethylene orbital implants. *Ophthalmology*. 2009; 116(2):349-54.
 28. Kim J, Cai Z, Chen Y. Biocompatible bacterial cellulose composites for biomedical application. *J Nanotechnol Eng Med*. 2010;1(1):1-7.
 29. Martins MC, Burnier Jr MN. Anatomia patológica das uveítes. In: Oréfice F, Editor. *Uveíte: clínica & cirúrgica: texto & atlas*. 2a ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2005. v.1. p.305-14.
 30. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J*. 1979; 11(4):447-55.

4.2 ARTIGO DOS RESULTADOS COMPLEMENTARES DESTA PESQUISA SUBMETIDO AO JOURNAL INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE THE ASSOCIATION FOR RESEARCH IN VISION END OPHTHALMOLOGY (ARVO)

ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS E IMUNOHISTOQUÍMICAS DO GEL CELULÓSICO BACTERIANO IMPLANTADO EM OLHOS EVISCERADOS DE COELHO

Sidcley Bernardino-Araújo; José Lamartine de Andrade Aguiar; Mariana Montenegro de Melo Lira; Diogo B. De Souza; José Luiz Lima Filho; Francisco de Assis Cordeiro-Barbosa

1-Pós-graduando do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE - Recife (PE), Brasil

2-Médico do Departamento de Cirurgia e Pesquisador Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE - Recife (PE), Brasil

3-Médica do Departamento de Patologia e Pesquisador Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE - Recife (PE), Brasil

4-Veterinário e Professor do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas da Universidade Estadual do Rio de Janeiro - UERJ

RESUMO

OBJETIVOS: Analisar a proliferação celular em geral, a angiogênese, a proliferação de células multinucleadas gigantes e a fibrogênese, por técnicas de histomorfometria e imunohistoquímica. **MÉTODOS:** Foram utilizados dezoito coelhos, distribuídos em seis grupos de três animais. Todos submetidos à evisceração dos seus olhos direitos, sendo a cavidade anóftálmica preenchida totalmente com gel celulósico obtido da fermentação bacteriana. Os bulbos oculares extraídos dos animais foram fixados em formalina a 10%, tamponada por 48 h, e depois seccionados no plano sagital em seu maior diâmetro, originando duas calotas aproximadamente iguais que foram processadas para obtenção de cortes histológicos semi-seriados em seguida corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) e o Tricrômio de Masson. Foram escolhidos aleatoriamente cinco cortes de cada animal e em cada corte foram colhidas cinco fotomicrografias de campos periféricos distintos, sob o aumento de 100X, capturando-se um total de vinte e cinco fotomicrografias por cada animal, isto é, 75 fotos por grupo. Nos campos corados pela HE foram quantificadas a densidade de superfície (Sv) da população celular em geral, dos vasos sanguíneos e especificamente das células multinucleadas gigantes (CMG), usando para tal o programa *ImageJ*. Naqueles cortes com coloração tricrômica, sob aumento de 200X, foi quantificada a Sv de fibras colágenas, neste caso usando o método de segmentação de cores e o programa *image pró-plus 4.5®*. A análise estatística foi realizada usando-se média, desvio padrão, coeficiente de variação e teste de Kruskal-Wallis. Foram feitas comparações múltiplas do referido teste ao nível de significância de 5%. Os cortes histológicos foram também imunomarcados com anticorpos anti-colágeno tipo I, anti-colágeno tipo III e Anti-CD31 procedendo-se a análise imunohistoquímica. Foi realizado também imunofluorescência indireta do colágeno I. **RESULTADOS:** A Média da densidade dos diversos tipos celulares e das células multinucleadas gigantes, no interior do implante, apresentou uma tendência crescente até o centésimo vigésimo (120°) dia do experimento, seguindo-se de uma discreta diminuição no ducentésimo quadragésimo (240°) dia. A média da densidade do colágeno cresceu até o nonagésimo (90°) dia, quando admitiu uma tendência decrescente. A média do percentual de vasos obedeceu uma tendência crescente

em todo período de avaliação, ressaltando-se uma oscilação entre o trigésimo (30°) e o sexagésimo (60°) dia. A imunohistoquímica identificou as fibras colágenas I e III, além da proliferação de células endoteliais. A imunofluorescência indireta demonstrou também a presença de fibras colágenas I. **CONCLUSÕES:** O implante celulósico nas órbitas de coelhos permitiu a proliferação de diversos tipos celulares, de vasos, de células multinucleadas gigantes, bem como a deposição de colágenos durante 240 dias. Os estudos imunohistoquímicos demonstraram a presença de colágenos tipo I e III e proliferação endotelial. A imunofluorescência indireta também demonstrou a presença do colágeno I. Fica, portanto, ratificado que o gel celulósico, usado neste experimento, além de biocompatível, se integrou às órbitas dos coelhos.

Descritores em Ciências da Saúde/DeCS: Cavidade anoftálmica, Coelhos, Bioprotese gel, Cana de açúcar, Implantes orbitários integrados.

ABSTRAT

PURPOSE: To analyze cellular proliferation in general, angiogenesis, proliferation of multinucleated giant cells and fibrogenesis by histomorphometry and immunohistochemistry techniques. **METHODS:** Eighteen rabbits were randomly divided into six groups of three animals. Todos undergoing evisceration of his right eye, and the cavity completely anóftalmicapreenchida with cellulose gel obtained from bacterial fermentation. The ocular bulbs extracted from the animals were fixed in 10% formalin buffered for 48 h, and then sectioned in the sagittal plane of its largest diameter, originating two approximately equal caps that have been processed to obtain then semi-serial histological sections stained by hematoxylin-eosin (HE) and Masson trichrome. Randomly selected sections from each animal five and each cut photomicrographs were taken five distinct peripheral fields under 100X, capturing a total of twenty-five photomicrographs per animal, i.e. 75 pictures per group. In the fields stained by HE were quantified surface density (Sv) of the cell population in general, specifically of vessels sanguíneose of multinucleated giant cells (CMG), using for this the ImageJ software. Those cuts with trichrome staining under

increased 200X, was quantified Sv of collagen fibers, in this case using the color segmentation method and the pro-plus 4.5® image program. Statistical analysis was performed using mean, standard deviation, coefficient of variation and the Kruskal-Wallis test. multiple comparisons of that test at a significance level of 5% were made. Histological sections were also immunostained with anti-type I collagen, anti-collagen type III and Anti-CD31 proceeding to immunohistochemical analysis. It was also performed immunofluorescence assay of collagen I. **RESULTS:** The average density of the various cell types and giant cells within the implant, showed a rising trend until the twenty hundredth (120th) day of the experiment, followed by a slight decrease in the two hundred and forty (240) day. The average collagen density increased until the ninetieth (90) day, when he admitted a downward trend. The average percentage of vessels followed a growing trend throughout the evaluation period, pointing out to an oscillation between the thirtieth (30º) and the sixtieth (60) day. Immunohistochemistry identified collagen I and III fibers, and the proliferation of endothelial cells. The indirect immunofluorescence also showed the presence of collagen fibers I. **CONCLUSION:** The cellulosic implantation in rabbits orbits allowed the proliferation of several cell types, vessels, multinucleated giant cells, and the deposition of collagen during 240 days. Immunohistochemical studies demonstrated the presence of collagen type I and III and endothelial proliferation. Indirect immunofluorescence also showed the presence of collagen I. It is therefore ratified the cellulose gel used in this experiment, and biocompatible, joined the orbits of rabbits.

Descriptors: Health Sciences/MeSH: anophthalmic Cavity, Rabbits, gel bioprosthesis, cane sugar, integrated orbital implants.

INTRODUÇÃO

Os tratamentos reparadores da cavidade anoftálmica, após as cirurgias de evisceração e enuclearão, continuam sendo procedimentos desafiadores e traumatizantes do ponto de vista psicológico, tanto para o doente quanto para o

oftalmologista. Atualmente, em todo mundo, continua alto o número de pacientes com indicação formal para esses tipos de cirurgia¹.

São inúmeros os tipos de implantes utilizados para reposição do conteúdo orbitário das cavidades anoftálmicas. Qualquer tipo de implante orbitário, integrado ou não, além dos problemas estéticos, está sujeito a deiscência conjuntival, infecção e extrusão. São considerados implantes integrados àqueles que permitem proliferação celular no seu interior, tornando-se inclusive vascularizados e não apenas àqueles de movimentos integrados implante-prótese^{2,4}.

Uso médico da celulose de origem bacteriana tem sido ampliado nos últimos anos. Diferente da celulose vegetal, a celulose bacteriana possui biocompatibilidade, biodegradabilidade, alto teor de pureza (não contém substâncias tóxicas como a lignina), alta estabilidade térmica, alta cristalinidade além de um grande poder de retenção de água. Essas características e propriedades podem atuar como fatores facilitadores no desencadeamento do processo cicatricial, porém sofrem variações de acordo com o sítio de implantação no organismo vivo^{5,6,17,19,20, 21,22}.

Dentre os processos de síntese de biopolímero celulósico bacteriano, está aquele desenvolvido, desde 1990, no Laboratório de Microbiologia Industrial da Estação Experimental de Cana de Açúcar ã Carpina, da Universidade Rural de Pernambuco. Trata-se de celulose pura obtida por síntese com bactéria *Zoogeleia sp.*, tendo melaço da cana de açúcar como substrato⁷.

No Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco, foi realizada, experimentalmente em coelhos, a reconstrução de cavidades anoftálmicas pós-evisceração usando-se para tal um implante de gel celulósico produzido pela *Zoogeleia sp.* Neste caso, o implante mostrou-se integrado, maleável, de superfície lisa e não tóxico para as órbitas de coelhos. Estas qualidades, sem dúvida, podem ajudar nas pesquisas para diminuição da frequência de extrusão dos implantes orbitários. Todavia melhores estudos, principalmente histomorfométricos e imunohistoquímicos, foram idealizados para melhor qualificar e quantificar as reações de biocompatibilidade e integração deste material ao organismo⁸. A biocompatibilidade representa a capacidade do biomaterial, prótese ou dispositivo permitir ao hospedeiro (paciente ou usuário) realizar uma determinada

função sem prejuízo para o organismo^{9,23,28}. A integração representa o conjunto de reações tissulares, inclusive vascularização do implante, resultantes de uma biocompatibilidade duradoura^{2,3,4,9,21,23,28}.

Todos os biomateriais aplicados em tecidos humanos e animais, sob a forma de próteses ou dispositivos médicos, levam a respostas características desses tecidos (biorreatividade). Essas respostas fazem parte de uma rota fisiopatológica que inclui injúria, interação sangue-material, formação de uma matriz extracelular provisória, reação inflamatória aguda e crônica, formação de tecido de granulação, cicatrização da ferida, reação tipo corpo estranho e resposta fibrosa com encapsulamento do biomaterial. A quantificação destas respostas e o tempo de duração das mesmas tornam-se importantes para o estabelecimento do rendimento, da segurança e da regulação de seu uso^{9,24,25,26}.

Com o objetivo de investigar detalhes dos processos de integração e biocompatibilidade de um implante de gel celulósico em cavidades anoftálmicas de coelhos, foi proposto o presente trabalho, para avaliar dentro do implante, a proliferação celular em geral; a angiogênese, a proliferação de células multinucleadas gigantes e a fibrogênese por técnica de histomorfometria, além de ratificar a presença da proliferação endotelial e a fibrogênese por técnicas imunohistoquímica.

MATERIAL E MÉTODOS

No Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), em convênio com a Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), foi realizado estudo experimental, longitudinal, descritivo, no período de 2012 a 2015.

Foram utilizados dezoito coelhos machos da raça Califórnia, saudáveis, jovens (com cinco meses de idade) e peso médio de 2,6 kg. A escolha dos coelhos, como animal de experimento, obedeceu à recomendação das pesquisas oftalmológicas translacionais, envolvendo próteses e implantes humanos^{8,9}. Durante o experimento, todos os animais foram igualmente submetidos à evisceração dos seus olhos direitos, de acordo com técnica preconizada na oftalmologia cirúrgica. Os olhos

esquerdos não foram manipulados e serviram para controle clínico e anatomopatológico. Os animais foram operados pelo mesmo cirurgião oftálmico e receberam visitas diárias do médico veterinário durante os 240 dias do experimento.

Cada coelho foi anestesiado com injeção intramuscular da solução de ketamina[®] (0,35 ml/kg peso) e xilasina[®] (0,25 ml/kg peso). Após evisceração do olho direito, o saco esclerocorneano foi suturado continuamente com Vicryl[®] 6.0. A cápsula de Tenon e a conjuntiva foram suturadas separadamente da esclera em pontos contínuos com fio Vicryl[®] 7.0. Para facilitar exames pós-operatórios, a córnea não sofreu recobrimento conjuntival. Depois de suturada, a cavidade foi preenchida totalmente com gel celulósico bacteriano, previamente esterilizados por irradiação gama⁸. Os eventuais locais de vazamentos ao longo da sutura escleral, foram corrigidos com pontos isolados do mesmo material. Nestes olhos operados, uma combinação de dexametasona e ciprofloxacino, na apresentação farmacêutica de pomada (Cilodex[®]) foi aplicada, uma vez por dia, durante os primeiros sete dias da experiência. Os animais com suspeita de dor foram tratados com Dipirona Sódica, 50 a 100 mg/kg por via sub-cutânea, a cada oito horas.

Os coelhos foram distribuídos em seis grupos, cada um com três animais. Cada grupo recebeu a denominação do dia da eutanásia e enucleação dos seus componentes ou seja um numeral representativo do período de vida após implante. G7 com eutanásia ao sétimo dia, G30 ao trigésimo dia, e assim por diante, nos grupos G60, G90, G120 e G240⁸.

Os bulbos oculares extraídos dos animais foram fixados em formalina a 10%, tamponada, por 48 h. Cada bulbo foi seccionado no plano sagital do seu maior diâmetro, originando duas calotas de tamanhos aproximadamente iguais. Seguiu-se a inclusão das mesmas em parafina. Procedendo-se, então, a microtomia para obtenção de cortes histológicos semi-seriados. Nestes cortes, corados pela hematoxilina-eosina (HE) e o Tricrômio de Masson, foram escolhidos aleatoriamente cinco preparações histológicas de por animal e em cada um deles foram colhidas cinco (05) fotomicrografias de campos periféricos distintos, sob o aumento de 100X, capturando-se um total de vinte e cinco (25) fotomicrografias por cada animal, isto é setenta e cinco (75) fotos por grupo. Nos campos corados pela HE foram

quantificadas a densidade de superfície (Sv) da população celular em geral, dos vasos sanguíneos especificamente das células multinucleadas gigantes (CMG). Esses parâmetros foram calculados usando-se um sistema de grade-teste M42, projetada na imagem por meio do programa *ImageJ*^{10,12,13}, respeitando a fórmula $Sv = Pp/Pt$, na qual Sv é a densidade de superfície de uma determinada estrutura, Pp é o número de pontos que tocam a estrutura desejada, e Pt é o número de pontos do sistema de grade-teste utilizado¹⁰. Os resultados de Sv foram expressos em porcentagem. Naqueles cortes com coloração tricrômica, sob aumento de 200X, foi quantificada a Sv de fibras colágenas, neste caso usando o método de segmentação de cores^{10,12,13}, no programa *Image Pro-plus 4.5*[®] (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Todas as fotomicrografias foram capturadas com o sistema Zeiss[®] (modelo AXIO, Oberkochen, Alemanha).

A ratificação da proliferação fibrosa e vascular foi realizada com a identificação da presença e a localização específica dos tipos de colágenos, bem como das células endoteliais. Para tanto, cortes histológicos foram imunomarcados com anticorpos anti-colágeno tipo I (*Ab6308 mouse monoclonal*, Abcam[®] Lote 796041, diluição 1:100), anti-colágeno tipo III (*Ab 6310 mouse monoclonal*, Abcam[®] Lote 724022, diluição 1:300). Anti-CD31 (*Ab24590 mouse monoclonal* Abcam[®] Lote 8065433, diluição 1:100). Resumidamente, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica enzimática com tripsina, eliminação da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, bloqueio de antígenos inespecíficos, antes da incubação com o anticorpo primário por 60 minutos em câmara úmida a 36°C. A incubação com o anticorpo secundário e a revelação foi realizada seguindo as orientações do fabricante do Kit (DAB, *Histostar plus*[®], *Invitrogen*[®]). Os cortes ainda foram contrastados com hematoxilina de Harris.

O colágeno tipo I foi também imunomarcado, com o mesmo anticorpo, pela técnica de imunofluorescência indireta. Os cortes foram observados no microscópio de epi-iluminação com lâmpada fluorescente (Olympus BX51, Tóquio, Japão) com câmera digital acoplada (Olympus DP72, Tóquio, Japão).

A análise estatística dos dados foi realizada considerando duas situações:

a) MÉDIA DOS CAMPOS POR ANIMAL (n = 3 animais por grupo).

b) MÉDIAS DAS LÂMINAS (n = 15 lâminas por grupo).

Os dados foram analisados descritivamente por média, desvio padrão, coeficiente de variação, e, inferencialmente, pelo teste Kruskal-Wallis com comparações múltiplas do referido teste ao nível de significância de 5%. A escolha do teste foi feita em função do número de animais em cada grupo sugerido pelo comitê de ética.

Este trabalho foi desenvolvido dentro dos preceitos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, sob CAAE nº 23076.005297/2008-87, respeitando os princípios propostos pela Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO).

RESULTADOS ESTATÍSTICOS

Quanto à densidade de superfície dos diversos tipos celulares que proliferaram no interior do implante, a Tabela 1 mostra que a média do percentual da densidade celular cresceu do sétimo (7º) ao centésimo vigésimo (120º) dia, tendo uma pequena redução no ducentésimo quadragésimo (240º) dia. A variabilidade expressa pelo CV não se mostrou elevada (< 50%), tanto na avaliação por animal quanto por lâmina. Foi verificada diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$), sendo confirmada esta diferença entre os grupos G7, G30 e G60, dos G90 e G120, além do G7 e G30 do G240.

Tabela 1 ã Densidade de superfície (Sv) da população celular em geral na periferia do implante. Avaliações por animal e por lâmina.

Grupos	Avaliação por animal			Avaliação por lâmina	
	Média	dp	CV (%)	dp	CV (%)
G7	16,15 ^A	1,35	8,36	3,09	19,13
G30	22,27 ^A	5,44	24,43	5,63	25,28
G60	33,60 ^{AC}	15,77	46,93	15,08	44,88
G90	57,69 ^B	4,91	8,51	15,23	26,40
G120	62,86 ^B	24,96	39,71	13,19	20,98
G240	52,85 ^{BC}	10,83	20,49	18,25	34,53

Legenda: dp ã desvio-padrão CV ã coeficiente de variação

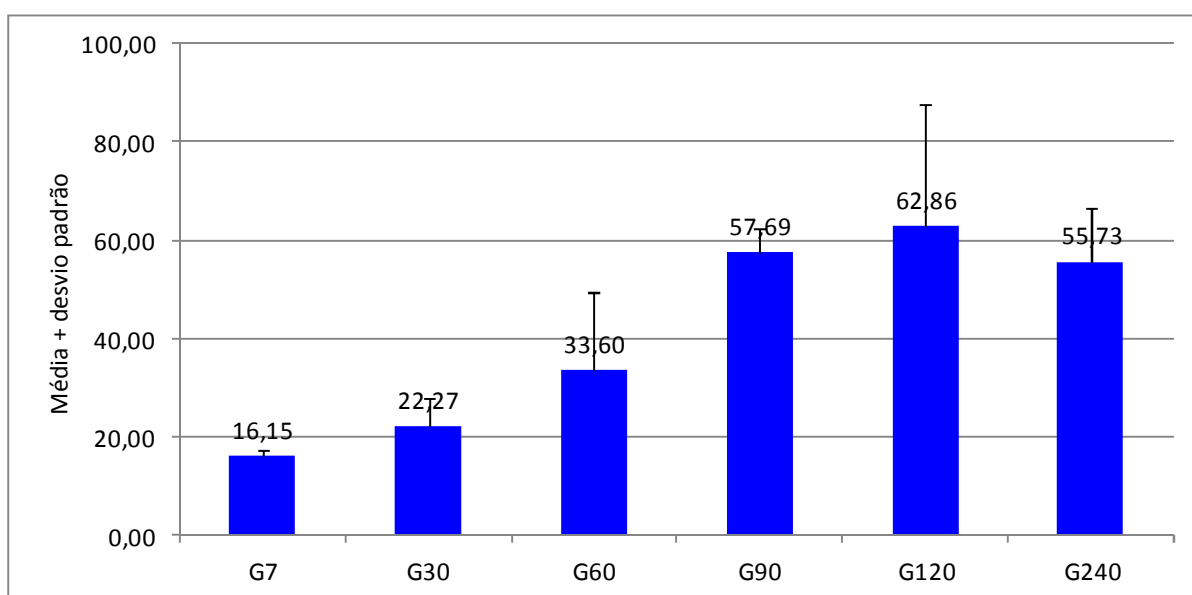
(*) : Diferença significativa em nível de 5,0%.

p=0,033 pelo teste de Kruskal-Wallis com comparações do referido teste.

Nos testes de comparações múltiplas se todas as letras são distintas se comprovam diferenças significativas entre os grupos correspondentes.

Fonte: Dados dos Autores

Gráfico 1 ã Média do percentual total de densidade celular segundo o grupo.



Quanto à densidade de vasos sanguíneos formados no interior do implante a tabela 2, mostra a média do percentual de vasos sanguíneos tanto por animal quanto por lâmina. Esta tabela mostra que a média foi menor no grupo G7 (0,43), maior no grupo G240 (10,41), seguida do grupo G30 (6,75) e cresceu do G60(4,17)

em diante até o final do experimento. Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos e as comparações múltiplas mostraram diferenças do grupo G240 com os demais; o grupo G7 foi também diferente de todos, exceto do G60; o grupo G30 foi diferente do G60 e G90. Em relação à variabilidade esta não foi elevada exceto no G7(<50%); com exceção do G90 que apresentou mesmo CV nas duas formas de avaliação, nos demais grupos, esta foi mais elevada quando se utilizou os dados por lâmina que por animal.

Tabela 2 Densidade de superfície (Sv) dos vasos formados na periferia do implante. Avaliações por animal e por lâmina.

Grupos	Avaliação por animal			Avaliação por lâmina	
	Média	dp	CV (%)	dp	CV (%)
G7	0,43 ^A	0,69	160,47	0,84	195,35
G30	6,75 ^B	1,54	22,81	2,53	37,48
G60	4,17 ^{AC}	0,79	18,94	1,46	35,01
G90	5,65 ^{BC}	2,63	46,55	2,63	46,55
G120	6,64 ^B	0,57	8,58	1,57	23,64
G240	10,41 ^D	1,28	12,30	2,20	21,13

Legenda: dp = desvio-padrão CV = coeficiente de variação

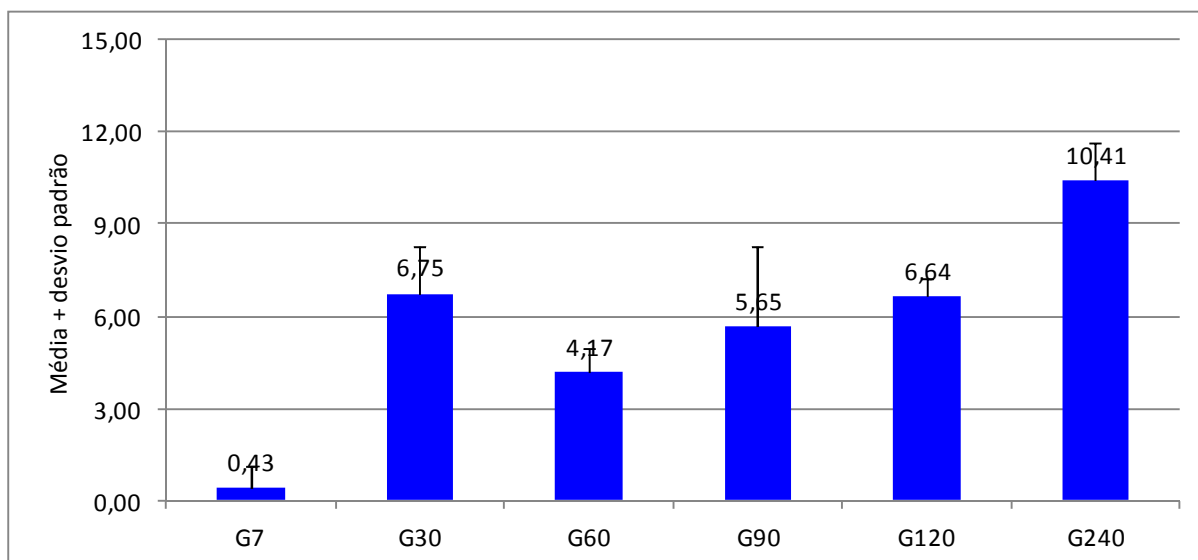
(*): Diferença significativa em nível de 5,0%.

$p = 0,016$ pelo teste de Kruskal-Wallis com comparações do referido teste.

Nos testes de comparações múltiplas se todas as letras são distintas se comprovam diferenças significativas entre os grupos correspondentes.

Fonte: Dados dos Autores

Gráfico 2 Média do percentual de vasos segundo o grupo.



Quanto a densidade de células multinucleadas gigantes que proliferaram no interior do implante, a Tabela 3 mostra a ausência das mesmas no Grupo G7 (7 dias após o implante), e a presença nos outros grupos com o aumento da média com o tempo de avaliação até 120º dia. Houve uma redução do G120 para G240, voltando ao valor próximo do G90. O teste estatístico mostrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Os testes de comparações múltiplas comprovam diferenças dos grupos G7 e G60 de todos, exceto com G30. Por sua vez o G30 foi diferente do G90, G120 e G240. A variabilidade por animal não se mostrou elevada ($< 50\%$), e, por lâmina oscilou de baixa ($< 30\%$) à razoavelmente elevada (72,6% no G30).

Tabela 3 Densidade de superfície da proliferação de células multinucleadas gigantes na periferia do implante. Avaliações por animal e por lâmina.

Grupos	Avaliação por animal			Avaliação por lâmina	
	Média	Dp	CV (%)	dp	CV (%)
G7	0,00 ^A	0,00	**	0,00	**
G30	3,91 ^{AB}	2,32	59,34	2,84	72,63
G60	14,90 ^B	7,25	48,66	7,80	52,35
G90	39,35 ^C	10,76	27,34	10,91	27,73
G120	47,85 ^C	23,13	48,34	21,49	44,91
G240	39,11 ^C	11,89	30,40	11,69	29,89

Legenda: dp = desvio-padrão CV = coeficiente de variação

(*): Diferença significativa em nível de 5,0%.

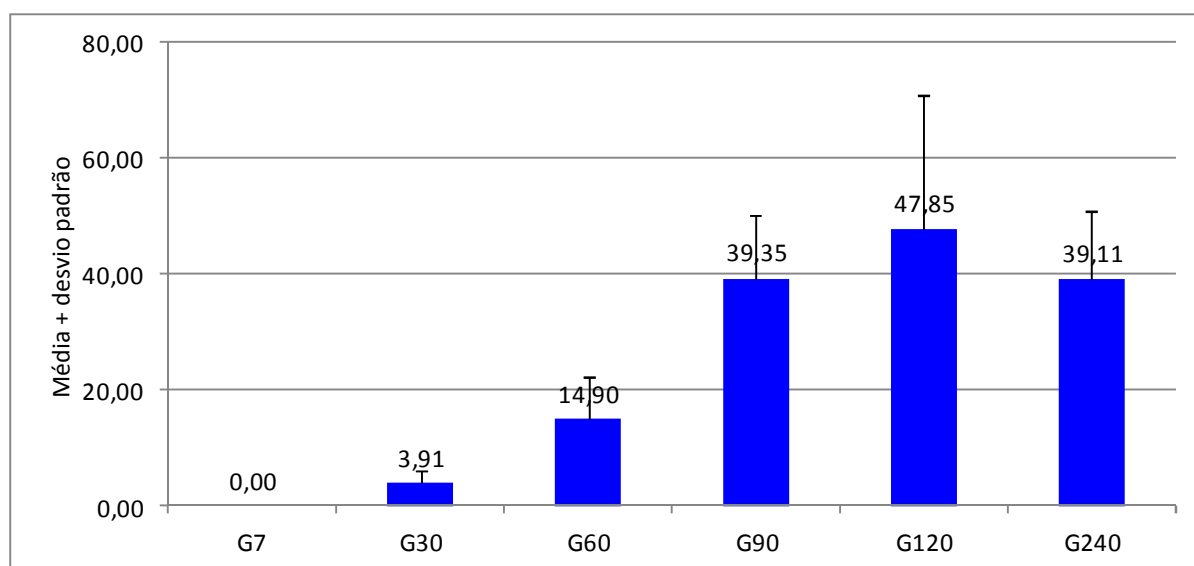
(**): Não foi determinado devido ao valor do desvio padrão nulo.

p=0,011 pelo teste de Kruskal-Wallis com comparações do referido teste.

Nos testes de comparações múltiplas se todas as letras são distintas se comprovam diferenças significativas entre os grupos correspondentes.

Fonte: Dados dos Autores

Gráfico 3 Média do percentual de GMC segundo o grupo.



Quanto a densidade de superfície (Sv) do colágeno depositado no interior do implante durante o experimento, a Tabela 4 mostra que a média foi nula no grupo G7, foi 13,10 no grupo G30 e 33,03 no grupo G90; a partir deste grupo passou a reduzir, tendo valor de 31,06 no grupo 120, e, baixando ainda mais, chegando a 13,57 no grupo G240, portanto próximo do G30. Foi verificada diferença significativa

entre os grupos ($p < 0,05$) sendo registradas as mesmas entre G7 dos demais, do G30, G60 e G240 com os grupos G90 e G120. A variabilidade não foi elevada ($<50\%$) em todos os grupos em ambas as análises. Correspondentemente sendo maior na avaliação por lâmina do que por animal.

Tabela 4 Densidade de superfície da deposição de colágeno na periferia do implante. Avaliações por animal e por lâmina.

Grupos	Avaliação por animal			Avaliação por lâmina	
	Média	dp	CV (%)	Dp	CV (%)
G7	0,00 ^A	0,00	**	0,00	**
G30	13,10 ^B	4,16	31,76	5,46	41,68
G60	17,32 ^B	6,54	37,76	7,24	41,80
G90	33,03 ^C	5,38	16,29	11,19	33,88
G120	31,06 ^C	6,28	20,22	11,46	36,90
G240	13,57 ^B	2,82	20,78	5,37	39,57

(*): Diferença significativa em nível de 5,0%.

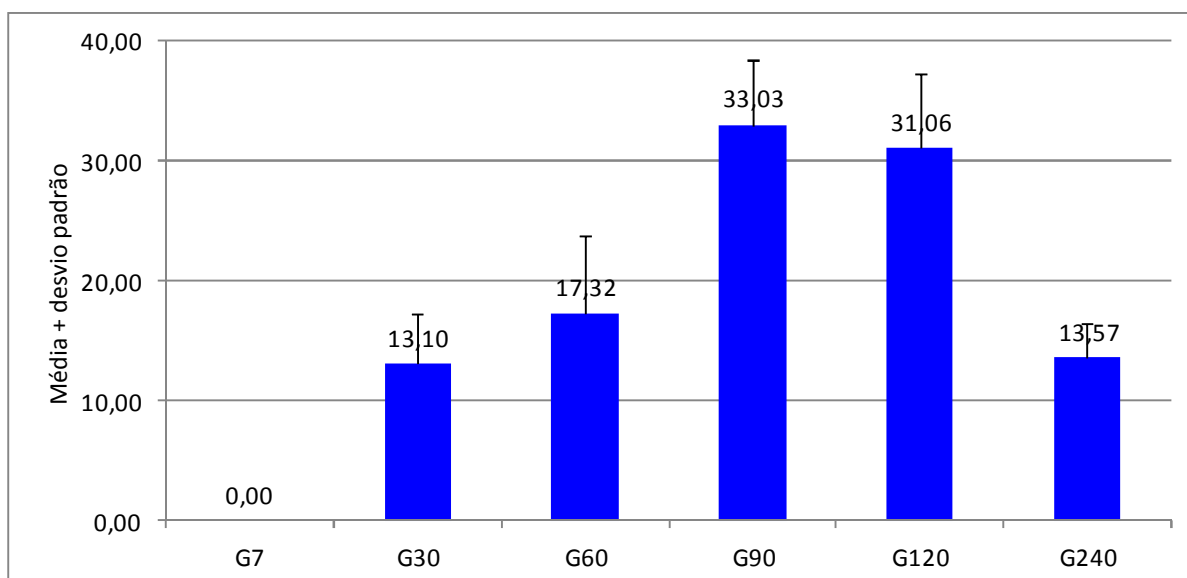
(**): Não foi determinado devido ao valor do desvio padrão nulo.

$p=0,012$ pelo teste de Kruskal-Wallis com comparações do referido teste.

Obs. Nos testes de comparações múltiplas se todas as letras são distintas se comprovam diferenças significativas entre os grupos correspondentes.

Fonte: Dados dos Autores

Gráfico 4 Média do percentual do percentual de colágeno segundo o grupo.

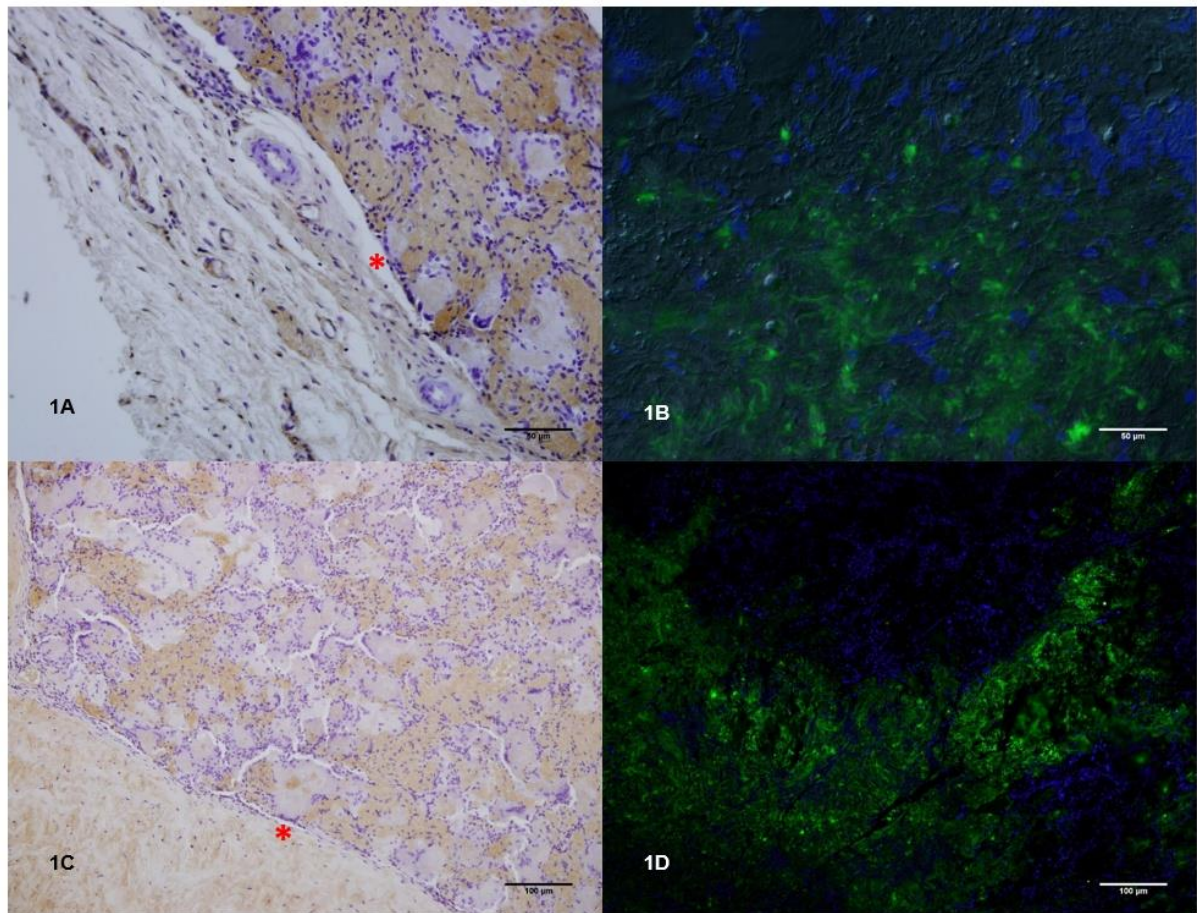


RESULTADOS IMUNOHISTOQUÍMICOS

O estudo imunohistoquímico, usando os anticorpos específicos, mostrou dois tipos de colágeno, tipo I e tipo III, presentes a partir do trigésimo dia do experimento. As fibras em questão foram depositadas num padrão centrípeto, isto é, da periferia para o centro, e, sempre secundária a ocupação do gel por células (figuras 1,2,3 e 4). Nos locais do implante, ainda não ocupado por células, as fibras colágenas não foram depositadas. O colágeno tipo I, imunomarcado pela técnica de imunofluorescência indireta mostrou positividade desta fibra na periferia do implante, junto à esclera. Esta técnica evidenciou as fibras colágenas tipo I em verde, os núcleos celulares em azul e o gel celulósico, ainda pouco povoado por células e sem deposição de fibras, em cinza escuro (Figura 4).

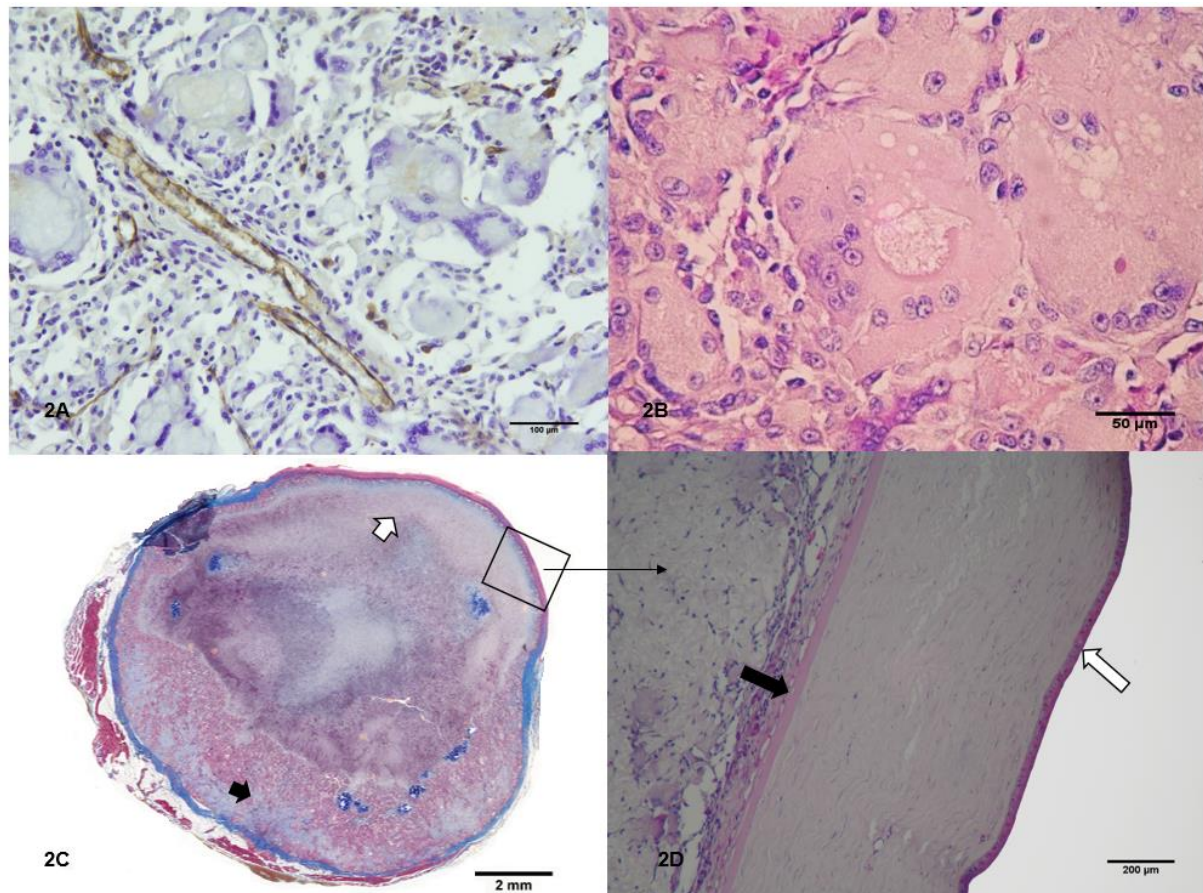
A análise imunohistoquímica, utilizando o anticorpo CD31, permitiu a marcação das células endoteliais com localização específica e precoce dos vasos sanguíneos. A partir do grupo G7, foi possível identificar dentro do implante, pequenos brotamentos endoteliais. Nos grupos G30 e G60 foram evidenciados vasos mais organizados, sugestivos de vênulas e arteríolas. Estes vasos, nos grupos subsequentes, diminuem em quantidade, porém, apresentavam-se melhor definidos e de maior calibre, permitindo assim a diferenciação histológica entre veias e artérias, alguns deles, extensos e margeados por tecido conjuntivo fibroso. Foi possível ainda, identificar longos vasos que se propagavam de uma margem a outra do implante (figura 5).

Figura 1 - Imunohistoquímica para colágeno tipo I, colágeno tipo III e imunofluorescência indireta para o colágeno tipo I, todos na interface (*) da esclera com implante.



Legenda: **A=** Observa-se positividade do colágeno I na matriz extracelular permeando as células multinucleadas gigantes. Aumento 100X. **B =** Detalhe da positividade para o colágeno I na matriz extracelular permeando as células multinucleadas gigantes. Aumento 200X. **C** Observa-se positividade do colágeno III na matriz extracelular permeando as células multinucleadas gigantes. Aumento 100X. **D =** Imunofluorescência indireta da deposição de colágeno do tipo I no implante de um animal do grupo G90. Área inferior da foto representa a interface escleral do implante. Enquanto a parte superior da mesma representa as porções mais centrais do mesmo. Perceber a predominância (positividade) do verde fluorescente deste colágeno I na parte inferior da foto. Em azul os núcleos celulares. A parte extrema e superior da foto, vista em cinza escuro, representa o gel celulósico ainda pouco povoado por células e sem deposição de colágeno.

Figura 2 ã Imunohistoquímica para antígeno citoplasmático específico em células endoteliais pelo CD31; Células multinucleadas gigantes coradas por HE no animal do grupo G240; Fotomicrografia panorâmica montada do olho do animal número 3 do grupo G90 corada por HE; Detalhe da interface córneo-implante HE 100X.



Legenda: **A**= observa-se positividade no endotélio de vasos sanguíneos dentro do implante. Aumento 200X; **B** =células gigantes multinucleadas dentro do implante, apresentando grande citoplasma central, vacúolos de diversos diâmetros contendo resquícios de biopolímeros e núcleos periféricos. Aumento 400X; **C** = perceber maior densidade celular na interface escleral (seta preta) do implante contrastando com a interface corneana (seta branca); **D** = integridade do endotélio (seta preta)e do epitélio corneano (seta branca) HE 100X.

DISCUSSÃO

A investigação do processo de integração do implante de gel celulósico em cavidades anoftálmicas, possibilitou a comprovação da presença de proliferação de células em geral, da proliferação endotelial, a angiogênese, a proliferação de células multinucleadas gigantes e a fibrogênese.

Ao analisar o percentual de densidade celular (Tabela 1) que representa a ocupação do implante por células de variados tipos, se identifica a presença das mesmas desde a primeira semana. O implante esteve povoado por células, embora em pequeno número, já no grupo G7. No processo foi observada uma tendência crescente da medida em questão desde que, a média foi menos elevada entre os animais sacrificados com 7 dias (16,15%), mais elevada entre os sacrificados com 120 dias (62,86%), com apenas uma pequena redução no grupo G240°(52,85 %). A variabilidade não se mostrou elevada desde que os valores dos desvios padrão não foram superiores aos valores das médias correspondentes ($CV < 50\%$ em todos os grupos na avaliação a partir das médias dos campos por animal ou na avaliação das médias dos campos por lâmina). Ressalte-se a presença de diferenças significantes entre as médias dos animais: os grupos G7 e G30 foram diferentes dos demais grupos, exceto do grupo G60; o grupo G60 foi diferente dos grupos G90 e G120.

A implantação de órgãos artificiais, dispositivos médicos ou biomateriais resultam em injúria e iniciação de uma resposta inflamatória. O tipo de proliferação celular, sua intensidade (densidade) e o tempo de duração da mesma têm sido muito usados para aferir a biocompatibilidade e integração do material implantado^{2, 3, 9, 11}. Como observado anteriormente por nosso grupo⁸, a implantação do gel celulósico de origem bacteriana nos olhos eviscerados de coelhos suscita uma resposta inflamatória aguda, de curta duração, com presença de polimorfonucleares neutrófilos, seguida logo depois de uma resposta crônica, com predomínio de linfócitos e plasmócitos, além de marcada participação de macrófagos e fibroblastos. Essa resposta crônica já acontece nos primeiros dias do experimento e se acompanhada de neovasogênese, síntese de fibras colágenas, associada à intensa formação de células multinucleadas gigantes⁸. A injúria promovida pelo ato de implantação, o tamanho, a forma, a topografia, além das propriedades físicas e químicas do biomaterial são fatores importantes para a qualidade dessas respostas. Daí a importância dos tratamentos químicos propostos para superfície do implante em geral. Diversos autores obtiveram resultados semelhantes com outros materiais e tecidos^{9, 11} sempre valorizando a intensidade e o tempo de duração da resposta celular inflamatória.

A densidade celular crescente, evidenciada na Tabela 1, para animais com até 240 dias de implantação, mostra sem dúvida que o gel celulósico de origem bacteriana em questão é um excelente meio para a proliferação celular, independente da natureza dessas células. Isto corrobora com o lógico raciocínio de biocompatibilidade. Vários trabalhos experimentais, em tecidos diferentes, demonstram que a inoculação do biopolímero celulósico, sob a forma gel ou sólida, oferece o mesmo ambiente de biocompatibilidade observado na presente pesquisa¹⁴⁻¹⁹.

A proliferação celular no interior do biopolímero celulósico também depende de diversos outros fatores, dentre os quais os poros existentes na matéria implantada. No caso do gel, esses poros são de aproximadamente 0,8 a 10 micrômetros²⁰⁻²². Poros pequenos facilitam a quimiotaxia tissular para o leito do biopolímero celulósico²², como também a vasogênese exercendo assim efeito de barreira contra a contaminação bacteriana. Por outro lado, o gel celulósico representa um artifício que aumenta o contato do biopolímero com as diferentes populações celulares e seus mecanismos moleculares, resultando em melhores condições de biointegração.

Quando voltamos à análise da duração da resposta inflamatória, observamos que, até o 120º dia do experimento, a população celular na periferia do implante aumentou quantitativamente de forma significativa. Ao identificar que, no centro do saco escleral, não havia grande proliferação celular, mesmo no 240º dia, se pode aventar a hipótese de que o processo de proliferação ocorre de forma centrípeta. Sendo assim, a análise quantitativa dos animais, decorridos 240 dias do transplante, não apresentou aumento celular porque os campos de avaliação foram feitos exclusivamente na periférica, e não central ou pelo menos intermediária.

Mais ainda, o fato de o implante gel, no seu centro, ao final do experimento, não estar ainda todo preenchido por células, pode sugerir uma proliferação mais duradora ainda, isto é, de longa duração.

Partindo do princípio que a proliferação celular em geral dentro do material implantado diz respeito a sua biocompatibilidade e que a duração desta proliferação

indica a integração do mesmo²³, é plausível afirmar que o gel celulósico, usado neste experimento, além de biocompatível, se integrou às órbitas dos coelhos.

Como descrito na fisiopatologia da inflamação em vários tecidos, logo no primeiro contato do material implantado, existem alterações nos vasos pré-existentes, por exemplo, remanescentes do saco escleral eviscerado. Nestes vasos, ocorrem alterações do fluxo, do calibre e da permeabilidade, que se associam a modificações na população hematológica no sítio da cirurgia. Aumento da permeabilidade da vasculatura pré-existente permite contato de mediadores químicos com o gel implantado. Agentes vasoativos, proteases plasmáticas, leucotrienos, proteases lisossomais, radicais livres derivados do oxigênio, fatores de agregação plaquetária, citocinas, fatores de crescimento, dentre outros, restritos aos espaços intravascular e intracelular, passam a figurar na superfície e intimidade do implante, ratificando o papel importante da fibrinose no saco escleral recém eviscerado. Na presente pesquisa, a vasogênese, precoce já comprovada pela histoquímica e agora ratificada pela imunohistoquímica parece ter contribuído também para fibrinose, principal componente da matriz provisória no início do experimento, e, elemento importante para angiogênese (Figuras 5). Isto também explica uma maior densidade celular na interface do material gel com o saco escleral (Figura 1,2 e 3). Outros autores detectaram uma maior proliferação celular junto ao saco escleral de cavidades anoftálmicas nas proximidades da inserção da musculatura extraocular, sítio notadamente mais vascularizado. Na figura panorâmica do bulbo no dia 90 observamos uma maior proliferação celular na interface escleral do implante que na interface corneana, sítio notadamente menos vascularizado.

Ao sétimo dia, após implante, a densidade de vasos era pequena com percentual inferior a 0,50%. Decorridos 30 dias, observou-se aumento do percentual de vasos, o qual se reduziu aos 60 dias do implante, para aumentar gradativamente, atingindo o maior percentual após 240 dias (10,41 %) do implante (Tabela 2). As diferenças entre os animais foram significativas e os testes posteriores indicaram diferenças significativas entre: o grupo G240 foi diferente dos demais grupos; o

grupo G7 foi diferentes dos demais exceto do G60; o grupo G60 foi diferente de G30 e G120.

A vasogênese, observada depois do sétimo dia dentro do implante, provavelmente sob ação de fatores de crescimento como VEGF, representa uma maior interação implante-hospedeiro, realçando mais ainda a tolerância sistêmica do organismo para com a matéria implantada. É importante ressaltar que esta rica vascularização, permite uma rápida resposta anti-infecciosa no implante, e garante a manutenção da nutrição tissular, bem como a ação de fármacos no interior do mesmo. Tudo isso corrobora com a integração do implante ao hospedeiro. A partir do grupo G30 foi possível identificar, dentro do implante, vasos sanguíneos bem definidos. Nos grupos subsequentes, esses vasos, apresentavam-se melhor definidos, extensos e de maior calibre, permitindo assim a diferenciação morfológica entre veias e artérias (Figuras 2 A).

A reação tipo corpo estranho, fase final da resposta inflamatória e de cicatrização após a implantação de um biomaterial, compreende a formação de células multinucleadas gigantes e afluxo de componentes do tecido de granulação, isto é: macrófagos, fibroblastos e vasos capilares. A forma e a topografia da superfície do material implantado determinam a composição da reação tipo corpo estranho^{9,23-25}. Elementos da reação tipo corpo estranho, como macrófagos e células gigantes, podem persistir na interface tecido-implante por toda vida do implante. Essas células têm sido relatadas em biomateriais implantados há vinte e oito anos, muito embora o turnover das mesmas não seja conhecido. Adsorção de proteínas plasmáticas e ativação do complemento na superfície do material, recrutamento de macrófagos com participação de citocinas e dos receptores de integrinas, além da sinalização e comunicação entre células, são eventos prévios da fusão de macrófagos e formação de células multinucleadas gigantes tipo corpo estranho. Trabalhos experimentais demonstram a importância da interleucina 4 (IL-4) na fusão de macrófagos na superfície de biomateriais. A IL-13 também foi confirmada como indutora de fusão de macrófago derivado de monócito. As ações dessas interleucinas estão relacionadas com a presença de receptor de manose na superfície do macrófago. Em decorrência de sua origem, as características

fenotípicas das células multinucleadas gigantes são similares aos fenótipos antigênicos dos macrófagos derivados de monócitos¹¹.

Vários trabalhos descrevem células multinucleadas gigantes especificamente associadas a biomateriais^{11,24,26,27}, além dos vários tipos de células multinucleadas gigantes presentes nos organismos em geral.

No presente trabalho, as células multinucleadas assumiram padrões morfológicos distintos com grande citoplasma central, ora homogêneo eosinofílico e ora com muitos vacúolos de diversos diâmetros e aspecto espumoso, contendo ou não resquícios de biopolímero. Os núcleos estavam em sua grande maioria na periferia do grande citoplasma, agrupados ou circundando todo o citoplasma (semelhante a um rosário). Esses núcleos, em sua maioria, possuíam apenas um nucléolo bem evidente e sua cromatina é finamente granular, disposta na periferia da carioteca (Figura 2B). Células multinucleadas em outros experimentos foram arroladas com participante do fenômeno de fagocitose frustrada. A Tabela 3, mostra o comportamento da população de células multinucleadas. Ao sétimo dia após implante, essas células estavam ausentes em todos os cortes examinados. A partir do trigésimo dia, entretanto, estiveram presentes e foram se tornando mais frequentes com aumento dos valores das médias de 3,91% entre os animais sacrificados com 30 dias até o 47,85% com 120 dias, sendo registrado um decréscimo para 39,11% com 240 dias. A variabilidade oscilou de baixa ($CV < 30\%$) a razoavelmente elevada (entre 50% e 75%). A Tabela 3 demonstra diferenças significativas entre os grupos G7 e G60 que foram diferentes dos demais, exceto do grupo G30; o grupo G30, diferente dos grupos G90, G120 e G240.

Outro fenômeno observado nesta pesquisa foi a fibrose (encapsulamento), a qual isola o implante, bem como a reação tipo corpo estranho do restante do tecido. Vale salientar que em alguns casos esse encapsulamento fibroso pode limitar a função do implante. No presente trabalho, por se tratar de um implante orbitário, o encapsulamento não deve ter muita influência na função do mesmo. Um profundo entendimento de como o sistema imunológico interage com os biomateriais pode se revelar crucial para a segurança, a biocompatibilidade e a função dos dispositivos ou implantes estudados^{26,28}.

Na Tabela 4, observa-se que, decorridos sete dias do implante, não foram identificadas fibras de colágeno nos cortes, as quais foram detectadas a partir do trigésimo dia. O percentual de fibras de colágeno então foi aumentando até G90 (Médias variaram de 13,10% a 33,03%) e a partir de G90 houve pequena redução de G90 para G120 (31,06%) e no grupo G240 a média foi aproximada do grupo G30. A variabilidade não se mostrou elevada (<50%) nas duas formas de avaliação, entretanto a citada medida foi mais elevada quando se analisou os resultados a partir das células das lâminas. Foi possível identificar três grupos com diferenças estatísticas entre si no estudo do colágeno. O grupo G7 foi marcado pela ausência de colágeno; os grupos G30, G60 e G240 com valores médios que oscilaram de 13,10% a 17,32% e G90 e G120 com as maiores médias. O material celulósico permitiu a fibrose e formação de cápsula de colágeno, o que representa a parte final da cicatrização de um bioimplante. Merece atenção que a deposição de colágeno também representa a formação de um tecido de granulação. A formação de novos capilares também faz parte da granulação. Ao considerar o encapsulamento um evento periférico ao implante, encontramos uma justificativa para o aumento substancial do colágeno até o 90° do experimento. Merece atenção o fato de que a quantificação do colágeno foi feita nos campos periféricos do implante gel. Isto por uma questão lógica, pois esta era a região onde suspeitávamos que houvesse depósito de colágeno e formação de uma cápsula fibrosa. Como pudemos evidenciar pelos estudos histológicos anteriores e os atuais imunohistoquímicos, enquanto na periferia do implante se formava uma cápsula de colágeno, no centro do implante novas fibras continuavam sendo depositadas. Ora, se os campos de estudo do colágeno fossem deslocados para o centro, é plausível supor que a Tabela 4 teria outra conformação e mostraria crescimento da deposição do colágeno até o final do experimento (Figura 1, 2, 3 e 4).

As fibras colágenas, produzidas pelos fibroblastos e outros tipos celulares, estão envolvidas no armazenamento e transmissão da energia elástica durante os movimentos realizados pelos tecidos e órgãos vivos. As fibras colágenas do tipo I representam 90% do colágeno corporal humano. É o principal componente da matriz extracelular de ossos, músculos, pele, tendões, ligamentos, olhos, dentre outros. As

fibras colágenas III são os principais componentes dos vasos sanguíneos, não podendo haver integração de implante sem a presença desse tipo de colágeno^{29,30}. O colágeno tipo IV, embora não marcado no presente trabalho, contribui para a formação de redes bidimensionais, sendo um dos principais componentes das membranas basais. Não é facilmente visível por microscopia de luz, mas pode ser evidenciado por técnicas de imuno-histoquímica^{9,23,31}.

A deposição do colágeno tipo III que acompanha a vascularização de um implante representa a integração do mesmo. Já a deposição do colágeno tipo I comprova a cicatrização plena bem como a remodelação final da matriz extracelular presente no implante^{9,23}. Embora visto em diversas colorações histoquímicas especiais, inclusive o *picrosirius red*⁸, a exata comprovação dos tipos de colágeno envolvidos na reação de integração de um implante só pode ser dada por técnicas de imuno-histoquímica³².

Em trabalho anterior, esse grupo de pesquisa demonstrou que o implante de gel celulósico se mostrou não tóxico e não provocou doença clinicamente aguda, como alergia, infecção e extrusão. Adicionalmente, foi ali também demonstrado que as córneas, preservadas pela técnica de evisceração escolhida, permaneceram transparentes até o fim do experimento (Figura 2D) apesar do íntimo contato com o gel celulósico, fato documentado histologicamente por preparações corneanas de vários animais, coradas por hematoxilina-eosina, onde fica patente a integridade das camadas daquele tecido, inclusive o endotélio. No entanto fica evidente que futuros estudos exaustivos, de imunofluorescência e imunohistoquímica, devem ser feitos no sentido de qualificar todos os tipos celulares presentes, fibras em geral depositadas além dos mediadores inflamatórios químicos na matriz extracelular.

Os estudos histomorfométricos, ao longo do experimento, demonstraram que no interior dos implantes aconteceram taxas crescentes de proliferação dos diversos tipos celulares, dos vasos, das células multinucleadas gigantes, bem como da deposição de colágenos. Os estudos imunohistoquímicos ratificaram a presença de colágenos tipo I e III e a proliferação endotelial, comprovado que o gel celulósico, usado neste experimento, além de biocompatível, se integrou às órbitas dos coelhos.

CONCLUSÕES

A biocompatibilidade do gel celulósico no interior da cavidade anoftálmica conferiu ao hospedeiro a manutenção do volume normal do globo ocular, permitindo ao mesmo as funções motoras e estética sem maiores prejuízos para o organismo. Esta biocompatibilidade deu sinais de ser duradoura e o conjunto de reações tissulares indicam a integração do implante ao organismo.

Referências

1. Amaro TAC, Yazigi L, Erwenne C. Aspectos psicológicos e qualidade de vida em pacientes com melanoma uveal durante o processo de tratamento por remoção do bulbo ocular. *Arq Bras Oftalmol*. 2006;69(6):889-94.
2. Perry C. Integrated orbital implants. *Adv Ophthalmic Plast Reconstr Surg*. 1990;8:75-81.
3. Rubin P, Popham J, Bilyk J, Shore J. Comparison of fibrovascular ingrowth into hydroxyapatite and porous polyethylene orbital implants. *Ophthalmol Plast Reconstr Surg*. 1994;10(2):96-103.
4. Sami D, Young S, Petersen R. Perspective on orbital enucleation implants. *Surv Ophthalmol*. 2007;52(3):244-65.
5. Shah N, Ul-Islam M, Khattak WA, Park JK. Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. *Carbohydr Polym*. 2013;98(2):1585-98.
6. Mello LR, Feltrin Y, Selbach R, Macedo G, Spautz C, Haas LJ. Uso da celulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001;59(2B):372-9.
7. Paterson-Beedle M, Kennedy JF, Melo FAD, Lloyd LL, Medeiros V. Cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. *Carbohydr Polym*. 2000;42(4):375-83.
8. Cordeiro-Barbosa FDA, Aguiar JLDA, Lira MMDM, Pontes Filho NTDP, Bernardino-Araújo S. Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated

- eyes: experimental model in rabbits. *Arq Bras Oftalmol*. 2012;75(4):267-72.
9. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res*. 2001;31(1):81-110.
 10. Felix-Patrício B, Souza DB, Gregório BM, Costa WS, Sampaio FJ. How to quantify penile corpus cavernosum structures with histomorphometry: comparison of two methods. *Biomed Res Int*. 2015;ID832156:1-6.
 11. Anderson JM. Exploiting the inflammatory response on biomaterials research and development. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26(3):120-1.
 12. Francisco JS, Moraes HP, Dias EP. Evaluation of the Image-Pro Plus 4.5 software for automatic counting of labeled nuclei by PCNA immunohistochemistry. *Braz Oral Res*. 2004;18(2):100-4.
 13. Felix-Patrício B, Medeiros JL, Souza DB, Costa WS, Sampaio FJB. Penile histomorphometrical evaluation in hypertensive rats treated with sildenafil or enalapril alone or in combination: a comparison with normotensive and untreated hypertensive rats. *J Sex Med*. 2015;12(1):39-47.
 14. Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater*. 2009;21(32-33):3307-29.
 15. Chung HJ, Park TG. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(4-5):249-62.
 16. Lina F, Yue Z, Jin Z, Guang Y. Bacterial cellulose for skin repair materials. In: Fazel R, editor. *Biomedical engineering: frontiers and challenges*. Shanghai: Intech; 2011. p. 250-74.
 17. Albuquerque PCVC, Aguiar JLA, Santos SM, Pontes Filho N, Mello RJV, Costa MLCR, et al. Comparative study of the areas of osteochondral defects produced in the femoral condyles of rabbits treated with gel of sugarcane biopolymer. *Acta Cir Bras*. 2011;26(5):383-6.
 18. Klemm D, Kramer F, Moritz S, Lindström T, Ankerfors M, Gray D, et al. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011;50(24):5438-66.
 19. Scherner M, Reutter S, Klemm D, Sterner-Kock A, Guschlbauer M, Richter T, et al. In vivo application of tissue-engineered blood vessels of bacterial cellulose as

- small arterial substitutes: proof of concept? *J Surg Res.* 2014;189(2):340ñ7.
20. Barros-Marques SR, Marques-Lins E, Albuquerque MCS, Andrade-Aguiar JL. Sugarcane biopolymer patch in femoral vein angioplasty on dogs. *J Vasc Surg.* 2012;55(2):517ñ21.
 21. Chen YM. In Vitro cytotoxicity of bacterial cellulose scaffolds used for tissue-engineered bone. *J Bioact Compat Polym.* 2009;24(Suppl 1):137ñ45.
 22. Medeiros Junior MD, Carvalho EJDA, Catunda IS, Bernardino-Araujo S, Aguiar JLDA. Hydrogel of polysaccharide of sugarcane molasses as carrier of bone morphogenetic protein in the reconstruction of critical bone defects in rats. *Acta Cir Bras.* 2013;28(4):233ñ8.
 23. Anderson JM. Future challenges in the in vitro and in vivo evaluation of biomaterial biocompatibility. *Regen Biomater.* 2016;3(2):73ñ7.
 24. Pinto FCM, De-Oliveira ACA, De-Carvalho RR, Gomes-Carneiro MR, Coelho DR, Lima SVC, et al. Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. *Carbohydr Polym.* 2016;137:556-560.
 25. Brodbeck WG, Anderson JM. Giant cell formation and function. *Curr Opin Hematol.* 2009;16(1):53.
 26. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008;20(2):86ñ100.
 27. Namdari S, Melnic C, Huffman GR. Foreign body reaction to acellular dermal matrix allograft in biologic glenoid resurfacing. *Clin Orthop Relat Res.* 2013;471(8):2455ñ8.
 28. Anderson JM, McNally AK. Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions. *Semin Immunopathol.* 2011;33(3):221ñ33.
 29. Reinke JM, Sorg, H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35-43.
 30. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007;25(1): 9-18.
 31. Sheikh Z, Brooks P, Barzilay O, Fine N, Glogauer M. Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials.

Materials.2015;8(9):5671ñ701.

32. StahnkeT, Löbler M, Kastner C, Stachs O, Wree A, Sternberg K, et al. Different fibroblast subpopulations of the eye: a therapeutic target to prevent postoperative fibrosis in glaucoma therapy. *Exp Eye Res*. 2012;100:88ñ97.
33. McNally AK, Anderson JM. Foreign body-type multinucleated giant cells induced by interleukin-4 express select lymphocyte co-stimulatory molecules and are phenotypically distinct from osteoclasts and dendritic cells. *Exp Mol Pathol*.2011;91(3):673-681.
34. Luttikhuizen DT, Harmsen MC, Luyn MJV. Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. *Tissue Eng*.2016;12(7):1955-1970.
35. Boyles MS, Young L, Brown DM, MacCalman L, Cowie H, Moisala A, et al. Multi-walled carbon nanotube induced frustrated phagocytosis, cytotoxicity and pro-inflammatory conditions in macrophages are length dependent and greater than that of asbestos. *Toxicol In Vitro*. 2015;29(7):1513-1528.
36. Syggelos SA, Aletras AJ, Smirlaki I, Skandalis SS. Extracellular matrix degradation and tissue remodeling in periprosthetic loosening and osteolysis: focus on matrix metalloproteinases, their endogenous tissue inhibitors, and the proteasome. *Biomed Res Int*. 2013;2013:230805.
37. Molteno AC, Suter AJ, Fenwick M, Bevin TH, Dempster, AG. Otago glaucoma surgery outcome study: cytology and immunohistochemical staining of bleb capsules around Molteno implants. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(5):1975-1981.
38. Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Mol Immunol*.2007;44(1), 82-94.
39. Quinn MT, Schepetkin IA. Role of NADPH oxidase in formation and function of multinucleated giant cells. *J Innate Immune*. 2009;1(6), 509-526.

5 CONCLUSÕES

Neste modelo experimental, o gel de celulósico duzido por *Zoogloea sp* tendo como substrato o melaço de cana de açúcar, foi comprovada a sua integração às órbitas dos coelhos, demonstrou ser biocompatível e atóxico para o organismo e o tecido heterólogo maleável formado, resultou numa prótese biológica por promover a manutenção estética face e dos movimentos oculares.

REFERÊNCIAS

- 1 AMARO, Terezinha Aparecida Carvalho; YAZIGI, Latife; ERWENNE, Clélia. Aspectos psicológicos e qualidade de vida em pacientes com melanoma uveal durante o processo de tratamento por remoção do bulbo ocular. **Arq. bras. oftalmol.**, São Paulo, v. 69, n. 6, p. 889-894, 2006.
- 2 PERRY, Arthur C. Integrated orbital implants. **Ophthalm. plast. reconstr. surg.**, New York, v. 6, n. 4, p. 333-344, 1990.
- 3 RUBIN, Peter A. D. et al. Comparison of fibrovascular ingrowth into hydroxyapatite and porous polyethylene orbital implants. **Ophthalm. plast. reconstr. surg.**, New York, v. 10, n. 2, p. 96-103, 1994.
- 4 SAMI, David; YOUNG, Steven; PETERSEN, Robert. Perspective on orbital enucleation implants. **Surv. ophthalmol.**, Boston, v. 52, n. 3, p. 244-265, 2007.
- 5 SHAH, Nasrullah et al. Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. **Carbohydr. polym.**, Inglaterra, v. 98, n. 2, p. 1585-1598, 2013.
- 6 MELLO, Luis Renato et al. Uso da celulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. **Arq. neuropsiquiatr.**, v. 59, n. 2-B, p. 372-379, 2001.
- 7 ALBUQUERQUE, Paulo Cezar Vidal Carneiro de et al. Comparative study of the areas of osteochondral defects produced in the femoral condyles of rabbits treated with gel of sugarcane biopolymer. **Acta cir. bras.**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 383-386, 2011.
- 8 SCHERNER, Maximilian et al. In vivo application of tissue-engineered blood vessels of bacterial cellulose as small arterial substitutes: proof of concept?. **J. surg. res.**, New York, v. 189, n. 2, p. 340-347, 2014.
- 9 BARROS-MARQUES, Silvio Romero de et al. Sugarcane biopolymer patch in femoral vein angioplasty on dogs. **J. vasc. surg.**, St. Louis, v. 55, n. 2, p. 517-521, 2012.
- 10 CHEN, Y. M. et al. In vitro cytotoxicity of bacterial cellulose scaffolds used for tissue-engineered bone. **J. bioact. compat. polym.**, Lancaster, v. 24, n. 1, p. 137-145, 2009.
- 11 MEDEIROS JÚNIOR, Martinho Dinoá et al. Hydrogel of polysaccharide of sugarcane molasses as carrier of bone morphogenetic protein in the reconstruction of critical bone defects in rats. **Acta cir. bras.**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 233-238, 2013.

- 12 PATERSON-BEEDLE, M. et al. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. **Carbohydr. polym.**, Inglaterra, v. 42, n. 4, p. 375-383, 2000.
- 13 CORDEIRO-BARBOSA, Francisco de Assis et al. Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes: experimental model in rabbits. **Arq. bras. oftalmol.**, São Paulo, v. 75, n. 4, p. 267-272, 2012.
- 14 ANDERSON, James M. Biological responses to materials. **Ann. rev. mater. res.**, Palo Alto, v. 31, n. 1, p. 81-110, 2001.
- 15 ANDERSON, James M. Future challenges in the in vitro and in vivo evaluation of biomaterial biocompatibility. **Regen biomater.**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 73-77, 2016.
- 16 ANDERSON, James M.; MCNALLY, Amy K. Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions. **Semin. immunol.**, Philadelphia, v. 33, n. 3, p. 221-233, 2011.
- 17 PINTO, Flávia Cristina Morone et al. Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. **Carbohydr. polym.**, Barking, v. 137, p. 556-560, 2016.
- 18 BRODBECK, William G.; ANDERSON, James M. Giant cell formation and function. **Curr. opin. hematol.**, Philadelphia, v. 16, n. 1, p. 53-57, 2009.
- 19 ANDERSON, James M.; RODRIGUEZ, Analiz; CHANG, David T. Foreign body reaction to biomaterials. **Semin. immunol.**, Philadelphia, v. 20, n. 2, p. 86-100, Apr. 2008.
- 20 WHITNALL, Samuel Ernest. **Anatomy of the human orbit and accessory organs of vision**. New York: Krieger, 1932.
- 21 KOORNNEEF, Leo. New insights in the human orbital connective tissue: result of a new anatomical approach. **Arch. ophthalmol.**, Chicago, v. 95, n. 7, p. 1269-1273, 1977.
- 22 KOORNNEEF, Leo. Orbital septa: anatomy and function. **Ophthalmology**, Philadelphia, v. 86, n. 5, p. 876-880, 1979.
- 23 RAGGE, N. K.; SUBAK-SHARPE, I. D.; COLLIN, J. R. O. A practical guide to the management of anophthalmia and microphthalmia. **Eye**, London, v. 21, n. 10, p. 1290-1300, 2007.
- 24 VERMA, Amit S.; FITZPATRICK, David R. Anophthalmia and microphthalmia. **Orphanet j. rare dis.**, London, v. 2, n. 1, p. 47, Nov. 2007.

- 25 GUERRERO, M. S. **Anoftalmos congénito**. In: CASILLAS, G. S. (Ed.). **Pérdida ocular**. México: Auroch, 2008. p. 1-11. v. 1.
- 26 SAMI, David; YOUNG, Steven; PETERSEN, Robert. Perspective on orbital enucleation implants. **Surv. ophthalmol.**, Boston, v. 52, n. 3, p. 244-265, 2007.
- 27 BOTELHO, Nara Lúcia Poli; VOLPINI, Marcos; MOURA, Eurípedes da Mota. Aspectos psicológicos em usuários de prótese ocular. **Arq. bras. oftalmol.**, São Paulo, v. 66, n. 5, p. 637-646, 2003.
- 28 PINE, Keith et al. Concerns of anophthalmic patients wearing artificial eyes. **Clin. experiment. ophthalmol.**, Carlton, v. 39, n. 1, p. 47-52, 2011.
- 29 THOMPSON, Andrew; KENT, Gerry. Adjusting to disfigurement: processes involved in dealing with being visibly different. **Clin. psychol. rev.**, Tarrytown, v. 21, n. 5, p. 663-682, 2001.
- 30 CLARKE, Alex et al. Psychosocial distress associated with disfiguring eye conditions. **Eye**, London, v. 17, n. 1, p. 35-40, 2003.
- 31 BONANNO, George A. et al. Weighing the costs of disaster: consequences, risks, and resilience in individuals, families, and communities. **Psychol. sci. public interest.**, Malden, v. 11, n. 1, p. 1-49, 2010.
- 32 ROBINSON, Emma; RAMSEY, Nichola; PARTRIDGE, James. An evaluation of the impact of social interaction skills training for facially disfigured people. **Br. j. plast. surg.**, Edinburgh, v. 49, n. 5, p. 281-289, 1996.
- 33 DEN TONKELAAR, I.; HENKES, H. E.; VAN LEERSUM, G. K. Herman Snellen (1834-1908) and müller's ðeform-augeö **Doc. ophthalmol.**, The Hague, v. 77, n. 4, p. 349-354, 1991.
- 34 GONZÁLEZ-TREVIÑO, Juan Luis et al. Criptoftalmos y ablefarón: presentación de un caso. **Rev. mex. oftalmol.**, Col. Nochebuena, v. 82, n. 3, p. 176-178, 2008.
- 35 SMIT, Ton J. et al. Management of acquired anophthalmos: a historical review. **Orbit**, Toronto, v. 10, n. 2, p. 63-76, 1991.
- 36 RAIZADA, K.; RANI, D. Ocular prosthesis. **Cont. lens anterior eye**, Basingstoke, v. 30, p. 152-162, 2007.
- 37 SONG, Jong-Suk; OH, Jaeryung; BAEK, Se Hyun. A survey of satisfaction in anophthalmic patients wearing ocular prosthesis. **Graefe's arch. clin. exp. ophthalmol.**, Berlin, v. 244, n. 3, p. 330-335, 2006.
- 38 HERNÁNDEZ, S. I. P.; CASILLAS, G. S. Implantes, opciones y ventajas. In: CASILLAS, G. S. (Ed.). **Pérdida ocular**. México: Auroch, 2008. p. 39-56.

- 39 PERRY, A. C. et al. Advances in enucleation. **Ophthalmol. clin. North Am.**, Philadelphia, v. 4, n. 1, p. 173-82, 1991.
- 40 KARESH, James W.; DRESNER, Steven C. High-density porous polyethylene (Medpor) as a successful anophthalmic socket implant. **Ophthalmology**, Philadelphia, v. 101, n. 10, p. 1688-1696, 1994.
- 41 BLAYDON, Sean M. et al. The porous polyethylene (Medpor) spherical orbital implant: a retrospective study of 136 cases. **Ophthal. plastic. reconstr. surg.**, New York, v. 19, n. 5, p. 364-371, 2003.
- 42 CHALASANI, Rajeev et al. Porous orbital implants in enucleation: a systematic review. **Surv. ophthalmol.**, Boston, v. 52, n. 2, p. 145-155, 2007.
- 43 JORDAN, David R.; KHOURI, Lucie M. Evisceration with posterior sclerotomies. **Can. j. ophthalmol.**, Ottawa, v. 36, n. 7, p. 404-407, 2001.
- 44 SMITH, Byron; PETRELLI, Richard. Dermis-fat graft as a movable implant within the muscle cone. **Am. j. ophthalmol.**, New York, v. 85, n. 1, p. 62-66, 1978.
- 45 MITCHELL, Kelly T. et al. The autogenous dermis-fat orbital implant in children. **J. APPOS**, St. Louis, v. 5, n. 6, p. 367-369, 2001.
- 46 GUBERINA, Carmen et al. Autogenous dermis-fat orbital implantation. **Arch. Ophthalmol.**, Chicago, v. 101, n. 10, p. 1586-1590, 1983.
- 47 ARCHER, Kathleen F.; HURWITZ, Jeffrey J. Dermis-fat grafts and evisceration. **Ophthalmology**, Philadelphia, v. 96, n. 2, p. 170-174, 1989.
- 48 BENGGOA-GONZÁLEZ, Álvaro et al. The use of autologous dermis grafts for the reconstruction of the anophthalmic socket. **Orbit**, Toronto, v. 29, n. 4, p. 183-189, 2010.
- 49 KALTREIDER, Sara A. The ideal ocular prosthesis: analysis of prosthetic volume. **Ophthal. plastic. reconstr. surg.**, New York, v. 16, n. 5, p. 388-392, 2000.
- 50 MASSRY, Guy G.; HOLDS, John B. Evisceration with scleral modification. **Ophthal. plastic. reconstr. surg.**, New York, v. 17, n. 1, p. 42-47, 2001.
- 51 ALWITRY, A. et al. Long-term follow-up of porous polyethylene spherical implants after enucleation and evisceration. **Ophthal. plastic. reconstr. surg.**, New York, v. 23, n. 1, p. 11-15, 2007.
- 52 USHER, Francis C.; OCHSNER, J.; TUTTLE JR, L. L. Use of marlex mesh in the repair of incisional hernias. **Am. surg.**, Atlanta, v. 24, n. 12, p. 969, 1958.

- 53 AMID, P. K. Classification of biomaterials and their related complications in abdominal wall hernia surgery. **Hernia**, Paris, v. 1, n. 1, p. 15-21, 1997.
- 54 BACHMAN, Sharon; RAMSHAW, Bruce. Prosthetic material in ventral hernia repair: how do I choose?. **Surg. clin. North America**, Philadelphia, v. 88, n. 1, p. 101-112, 2008.
- 55 GUTIÉRREZ-SAMPERIO, César et al. Bioprótesis de pericardio bovino tratado con glutaraldehído (PBTG) en la reconstrucción de la pared abdominal. **Cir. & cir.**, México, v. 70, n. 4, p. 257-266, 2002.
- 56 GARCÍA-UREÑA, Miguel Ángel et al. Differences in polypropylene shrinkage depending on mesh position in an experimental study. **The American journal of surgery**, New York, v. 193, n. 4, p. 538-542, 2007.
- 57 DILL, Ken A. et al. The protein folding problem. **Ann. rev. biophys.**, Palo Alto, v. 37, p. 289-316, 2008.
- 58 KLOCK, Umberto et al. **Química da madeira**. Curitiba: UFPR, 2005. v. 3.
- 59 WALTON, Alan G.; BLACKWELL, John. **Biopolymers**. [S. l.]: Academic Press, 1973.
- 60 SCHULTE, Tobias L. et al. The effect of dynamic, semi-rigid implant son the range of motion of lumbar motion segments after de compression. **Eur. Spine j.**, Heiv. 17, n. 8, p. 1057-1065, 2008.
- 61 WAKITANI, Shigeyuki et al. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. **J. bone Joint Surg. Br.**, Alemanha, v. 71, n. 1, p. 74-80, Jan. 1989.
- 62 YAMANAKA, Osamu; HOBBS, Robert E. Coronary artery anomalies in 126,595 patients under going coronary arteriography. **Catheter. cardiovasc. diagn.**, New York, v. 21, n. 1, p. 28-40, 1990.
- 63 KLEMM, Dieter et al. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. **Angew. chem. int. ed. eng.**, Alemanha, v. 50, n. 24, p. 5438-5466, 2011.
- 64 PUTRA, Ananda et al. Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface. **Polymer**, [S. l.], v. 49, n. 7, p. 1885-1891, Apr. 2008.
- 65 HELENIUS, G. et al. *In vivo* biocompatibility of bacterial cellulose. **J. biomed. mater. res.**, Hoboken, v. 76, n. 2, p. 431-438, 2005.
- 66 SILVEIRA, Raquel Kelner. **Eficácia da membrana de celulose produzida pela Zoogloea sp na forma multiperfurada comparada à forma compacta e à membrana sintética de politetrafluoretileno expandido na correção cirúrgica**

- de falha músculo-aponeurótica aguda induzida em ratos.** 2009. 94 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.
- 67 LIMA, Frederico de Melo Tavares de. **Membrana de biopolímero de cana-de-açúcar como substituto de dura-máter em ratos Wistar.** 2008. 73 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Universidade Federal de Pernambuco, 2008.
- 68 COELHO JÚNIOR, Elisio Rodrigues. **Prevenção de aderências peritoneais uterinas com gel de biopolímero de cana-de-açúcar em ratas.** 2012. 101 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Universidade Federal de Pernambuco, 2012.
- 69 CAVALCANTI, Catarine Bezerra. **Desenvolvimento e caracterização de biocompósito de biopolímero produzido pela Zoogloea sp.** 2009. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, 2009.
- 70 MELO, Francisco de Assis Dutra. **Contribuição ao estudo cinético da produção de polissacarídeos extracelulares por Zoogloea sp em melaço de cana-de-açúcar.** 2003. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Pernambuco, 2003.
- 71 CASTRO, C. M. et al. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. **An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb.,** Recife, v. 49, n. 2, p. 119-23, 2004.
- 72 LUCENA, Maurilio Toscano de et al. Biocompatibility and cutaneous reactivity of cellulosic polysaccharide film in induced skin wounds in rats. **J. mater. sci., Mater. med.,** London, v. 26, n. 2, p. 1-6, Feb. 2015.
- 73 LIMA, Salvador Vilar Correia et al. The biocompatibility of a cellulose exopolysaccharide implant in the rabbit bladder when compared with dextranomer microspheres plus hyaluronic acid. **Urology,** Ridgewood, v. 85, n. 6, p. 1520-1526, Jun. 2015.
- 74 SILVA, Dinalva Barros da et al. Miringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero de cana de açúcar em Chinchilla Laniger. **An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb.,** Recife, v. 51, n. 1, p. 45-51, 2006.
- 75 MARQUES, Silvio Romero de Barros et al. A new vascular substitute: femoral artery angioplasty in dogs using sugarcane biopolymer membrane patch-hemodynamic and histopathologic evaluation. **J. vasc. bras.,** [S. l.], v. 6, n. 4, p. 309-315, 2007.
- 76 AGUIAR, José Lamartine de Andrade et al. Surgarcane biopolymer patch in femoral artery angioplasty on dogs. **Acta cir. bras.,** São Paulo, v. 22, p. 77-81, 2007.

- 77 LUCENA, Roberto Gonçalves de. **Utilização do biopolímero de cana-de-açúcar como novo material para sling pubo vaginal**: análise estereológica. 2007. 109 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.
- 78 RANGEL, A. E. et al. Um novo biomaterial para o tratamento do refluxo vesicouretral: estudo experimental. **Int. braz. j. urol.**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. A184, 2006.
- 79 FERRAZ, L. C. et al. Implantes de polietileno gel e poroso em cavidade anoftálmica de coelhos. **Arq. bras. oftalmol.**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 304-308, 2006.
- 80 TAKAHAGI, R. U. et al. Avaliação quantitativa das dimensões óculo-palpebrais em portadores de cavidade anoftálmica em uso de prótese ocular externa. **Arq. bras. oftalmol.**, São Paulo, v. 68, n. 4, p. 517-20, 2005.
- 81 BRIK, D. Aplicação de película de celulose em lesões epiteliais da córnea. Estudo experimental comparativo. **Arq. bras. oftalmol.**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 215-20, 1991.
- 82 SCHOENAU, L. S.; PIPPI, N. L. Aspectos morfológicos e funcionais da córnea: uma breve revisão. **Hora vet.**, Porto Alegre, v. 12, n. 72, p. 49-53, 1993.
- 83 HICKS, Celia R. et al. Orbital implants: potential new directions. **Expert rev. med. devices.**, London, v. 3, n. 6, p. 805-815, Nov. 2006.
- 84 MICHALANY, Jorge. **Técnica histológica em anatomia patológica**: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. São Paulo: Michalany, 1998.
- 85 TIMM, Lílian de L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Cad. La Salle XI**, Canoas, v. 2, n. 1, p. 231-239, 2005.
- 86 FELIX-PATRÍCIO, B. et al. How to quantify penile corpus cavernosum structures with histomorphometry : comparison of two methods. **Biomed. res. int.**, [S. l.], v. 2015, p. 1-6, 2015.
- 87 ANDERSON, J. M. Exploiting the inflammatory response on biomaterials research and development. **J. mater sci. Mater. med.**, London, v. 26, n. 3, p. 120-121, 2015.
- 88 FRANCISCO, J. S.; MORAES, H. P.; DIAS, E. P. Evaluation of the image-pro plus 4.5 software for automatic counting of labeled nuclei by PCNA immunohistochemistry. **Braz. oral res.**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 100-104, 2004.
- 89 FELIX-PATRÍCIO, B. et al. Penile histomorphometrical evaluation in hypertensive rats treated with sildenafil or enalapril alone or in combination: a comparison with

normotensive and untreated hypertensive rats. **J. sex med.**, [S, l.], v. 12, n. 1, p. 39-47, 2015.

APÊNDICE A Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes:experimental model in rabbits

ARTIGO PUBLICADO

Título: Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes: experimental model in rabbits

Autores: Francisco de Assis Cordeiro-Barbosa, José Lamartine de Andrade Aguiar, Mariana Montenegro de Melo Lira, Nicodemos Teles de Pontes Filho, Sidcley Bernardino-Araújo

Revista: Arquivos Brasileiros de Oftalmologia

Cities per doc (SCOPUS):

Impact Factor (web of Science): 0.417

Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes: experimental model in rabbits

Uso de um biopolímero na forma gel para o tratamento de olhos eviscerados: modelo experimental em coelhos

Francisco de Assis Cordeiro-Barbosa¹, José Lamartine de Andrade Aguiar¹, Mariana Montenegro de Melo Lira², Nicodemus Teles de Pontes Filho², Sidcley Bernardino-Araújo³

ABSTRACT

Purpose: To evaluate histologically the integration process of cellulose gel produced by *Zoogloe* sp when implanted into rabbits eviscerated eyes.

Methods: This experimental study employed 36 eyes of 18 rabbits subjected to evisceration of their right eyes. The sclerocorneal bag was sutured and filled with biopolymer from sugar cane in the gel state. All animals were clinically examined by biomicroscopy until the day of their sacrifice which occurred on the 7th, 30th, 60th, 90th, 120th, or 240th day. The eyeballs obtained, including the left eyes considered controls were sent for histopathological study by optical macroscopy and microscopy. Tissue staining techniques used included hematoxylin-eosin, Masson trichrome (with aniline), Gomori trichrome, Van Gienson, Picrosirius red, and periodic acid-Schiff (PAS).

Results: No clinical signs of infection, allergy, toxicity, or extrusion were observed throughout the experiment. The corneas were relatively preserved. Macroscopic examination revealed a decrease of ~ 8% in the volume of the bulbs implanted with the biopolymer. After cutting, the sclerocorneal bag was solid, compact, elastic, and resistant to traction, with a smooth and whitish surface, and showed no signs of necrosis or liquefaction. The episcleral tissues were somewhat hypertrophied. The histological preparations studied in different colors revealed an initial lymphoplasmacytic infiltration, replaced by a fibroblastic response and proliferation of histiocytes, along with formation of giant cells. Few polymorphonuclear neutrophils and eosinophils were also found. Neovascularization and collagen deposition were present in all animals starting from day 30; although on the 240th day of the experiment the chronic inflammatory response, neovascularization and collagen deposition had not yet reached the center of the implant.

Conclusion: In this model, the cellulose gel produced by *Zoogloe* spp proved to be biocompatible and integrated into the orbits. Morphometric, immunohistochemical and biodegradability studies should be performed in the future.

Keywords: Eye enucleation; Eye evisceration; Bioprosthesis; Eye, artificial; Saccharum; Orbital implants; Biopolymers; Models, animal; Rabbits

RESUMO

Objetivos: Avaliar histologicamente o processo de integração do gel da celulose produzida pela *Zoogloe* sp implantado em olhos eviscerados de coelhos.

Métodos: Estudo experimental utilizando 36 olhos de 18 coelhos. Todos eles tiveram seus olhos direitos eviscerados. A bolsa escleral foi suturada e preenchida com biopolímero da cana de açúcar, no estado gel. Todos os animais foram examinados clinicamente, sob biomicroscopia, até o dia de seus sacrifícios e enucleações que aconteceram no 7^o, 30^o, 60^o, 90^o, 120^o e 240^o dia. Os bulbos obtidos, inclusive os esquerdos, considerados controles, foram encaminhados para estudo histopatológico de macroscopia e microscopia óptica. As colorações pela hematoxilina-eosina, tricômio de Masson (com anilina), tricômio de Gomori, Van Gienson e Picrosirius red e ácido periódico de Schiff (PAS) foram usadas.

Resultados: Durante o experimento não foram observados sinais clínicos de infecção, alergias, intoxicação ou extrusão. As córneas apresentavam-se relativamente preservadas. Exame macroscópico revelou uma diminuição de aproximadamente 8% no volume dos bulbos nos quais o biopolímero foi implantado. O corte do saco escleral mostrou um conteúdo sólido, compacto, elástico, resistente à tração, com superfície lisa e brancacenta. Não foram observados sinais de necrose, ou liquefação. O tecido episcleral estava algo hipertrofiado. As preparações histológicas estudadas, nas diversas colorações, revelaram uma infiltração linfomononuclear inicial, substituída posteriormente por uma resposta fibroblástica e proliferação de histiócitos com formação de células multinucleadas gigantes. Foram também encontrados poucos polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos. A partir do 30^o dia houve proliferação vascular e deposição de colágeno em todos os espécimes estudados, embora, no 240^o dia do experimento, a resposta inflamatória crônica, a neovascularização e a deposição do colágeno não tinham ainda atingido o centro do implante.

Conclusão: Neste modelo, o gel da celulose produzido pela *Zoogloe* sp, mostrou-se biocompatível e integrado às órbitas. Estudos morfométrico, imuno-histoquímico e de biodegradabilidade devem ser realizados futuramente.

Descritores: Enucleação ocular; Evisceração do olho; Bioprótese; Olho artificial; Saccharum; Implantes orbitários; Biopolímeros; Modelos animais; Coelhos

Submitted for publication: February 14, 2012 Accepted for publication: May 15, 2012

Study carried out at Department of Surgery and Laboratory of Immunopathology KeizoAssami,- Universidade Federal de Pernambuco - UFPE - Recife (PE), Brazil.

¹ Physician, Department of Surgery and Laboratory of Immunopathology KeizoAssami, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE - Recife (PE), Brazil.

² Physician, Department of Pathology and Laboratory of Immunopathology KeizoAssami, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE - Recife (PE), Brazil.

Biologist, Department of Pathology and Laboratory of Immunopathology KeizoAssami, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE - Recife (PE), Brazil. **Funding:** This study was supported by Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

Disclosure of potential conflicts of interest: F.A.Cordeiro-Barbosa, Provision of writing assistance, medicines, equipment, or administrative support by Universidade Federal de Pernambuco and Board Membership of University Hospital of Universidade Federal de Pernambuco; J.L.A.Aguilar, Provision of writing assistance, medicines, equipment, or administrative support by Universidade Federal de Pernambuco and Board Membership of University Hospital of Universidade Federal de Pernambuco; M.M.M.Lira, Provision of writing assistance, medicines, equipment, or administrative support by Universidade Federal de Pernambuco and Board Membership of University Hospital of Universidade Federal de Pernambuco; N.T.PontesFilho, Provision of writing assistance, medicines, equipment, or administrative support by Universidade Federal de Pernambuco and Board Membership of University Hospital of Universidade Federal de Pernambuco; S.Bernardino-Araújo, Provision of writing assistance, medicines, equipment, or administrative support by Universidade Federal de Pernambuco and Board Membership of University Hospital of Universidade Federal de Pernambuco.

Correspondence address: Francisco Cordeiro-Barbosa. Av. Boa Viagem, 5450/3001 - Recife - PE-51030-000 - Brazil - E-mail: oftalpe@hotmail.com

The present study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of UFPE following the principles proposed by Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO).

APÊNDICE B ã Effect of sugarcane biopolymer in vocal fold of rabbits: comparative study with calcium hydroxyapatite

ARTIGO PUBLICADO

Título: Effect of sugarcane biopolymer in vocal fold of rabbits. Comparative study with calcium hydroxyapatite

Autores: Silvio José de Vasconcelos, Rodrigo Augusto Souza Leão, Sidcley Bernardino-Araújo, Mariana Montenegro de Melo Lira, Domingos Hiroshi Tsuji

Revista: Acta Cirurgica Brasileira

Cities per doc (SCOPUS):

Impact Factor (web of Science): 0.661

Effect of sugarcane biopolymer in vocal fold of rabbits. Comparative study with calcium hydroxyapatite¹

Silvio José de Vasconcelos^I, Rodrigo Augusto Souza Leão^{II}, Sidcley Bernardino-Araújo^{III}, Mariana Montenegro de Melo Lira^{IV}, Domingos Hiroshi Tsuji^V

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865020150030000004>

^IFellow PhD degree, Postgraduate Program in Otolaryngology, University of Sao Paulo (USP), Brazil. Acquisition of data, technical procedures, statistical analysis, manuscript preparation.

^{II}PhD, Department of Otolaryngology and Head and Neck Surgery, Agamenon Magalhaes Hospital, Recife-PE, Brazil. Acquisition of data, technical procedures.

^{III}Master, Department of Pathology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil. Technical procedures.

^{IV}PhD, Associate Professor, Department of Pathology, UFPE, Recife-PE, Brazil. Macroscopic and

histopathological examinations. ^VPhD, Associate Professor, Department of Otolaryngology, USP, Sao Paulo-SP, Brazil. Manuscript writing, critical revision.

PURPOSE: To compare the inflammatory reaction caused by the injection of a sugarcane biopolymer (SCB) into the vocal fold of rabbits with that caused by calcium hydroxyapatite (CaH).

METHODS: CaH (Radiess®) and SCB gel were injected respectively into the right and left vocal cords of thirty rabbits. The rabbits were distributed into two equal groups and sacrificed at three and twelve weeks after injection. We then evaluated the intensity of the inflammatory reaction, plus levels of neovascularization, fibrogenesis and inflammatory changes in the vocal mucosa.

RESULTS: The vocal cords injected with CaH had a stronger inflammatory reaction by giant cells in both study periods. The SCB group had a more intense inflammatory involvement of polymorphonuclear cells three weeks after injection. SCB caused a higher level of neovascularization compared with CaH three weeks after the procedure.

CONCLUSION: Whereas calcium hydroxyapatite triggers a more intense and lasting inflammatory reaction mediated by giant cells, sugarcane biopolymer causes a greater response from polymorphonuclear leukocytes, as well as higher levels of neovascularization three weeks after injection.

APÊNDICE C ñ Immunohistopathological changes in murine Schistosomiasis
mansoni under the influence of N-acetyl-L-cysteine

ARTIGO PUBLICADO

Título: Immunohistopathological changes in murine Schistosomiasis mansoni under the influence of N-acetyl-L-cysteine

Autores: André de Lima Aires, Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque, Renata Alexandre Ramos Silva, Giuliana Viegas Schirato, Nicodemos Teles de Pontes Filho, **Sidcley Bernardino de Araújo**, Valdênia Maria Oliveira Souza, Vláudia Maria Assis Costa e Elizabeth Malagueño

Revista: Parasitology Research

Cities per doc (SCOPUS):

Impact Factor (web of Science): 2.098

Immunohistopathological changes in murine *Schistosomiasis mansoni* under the influence of N-acetyl-L-cysteine

André de Lima Aires &
Mônica Camelo Pessôa de Azevedo Albuquerque &
Renata Alexandre Ramos Silva &
Giuliana Viegas Schirato &
Nicodemos Teles de Pontes Filho &
Sidclely Bernardino de Araújo &
Valdênia Maria Oliveira Souza &
Vlaudia Maria Assis Costa & Elizabeth Malagueño

Received: 7 October 2011 / Accepted: 4 June 2012
Springer-Verlag 2012

Abstract The main pathology associated with *Schistosomiasis mansoni* is granulomatous inflammation that may develop into hepatosplenic disease with fibrosis and hepatosplenomegaly. It is known that N-acetyl-L-cysteine (NAC) reduces tissue damage in chronic liver diseases owing to its anti-inflammatory, antioxidant, and detoxifying properties. In this study, we investigated the immunohistopathological changes in murine *Schistosomiasis mansoni* under the influence of NAC, in combination with Praziquantel (PZQ) or not. Three groups of mice were formed to evaluate the effects of NAC during infection in the acute, intermediate, and chronic phases. Each

A. de Lima Aires · R. A. R. Silva · V. M. O. Souza · V. M. A. Costa · E. Malagueño
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, Pernambuco, Brazil

M. C. P. de Azevedo Albuquerque (*) Departamento de Medicina Tropical e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA),
Universidade Federal de Pernambuco,
Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife 50670-420 Pernambuco, Brazil
e-mail: jcmonica@globo.com

G. V. Schirato
Biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães,
CPqAM/FIOCRUZ,
Recife, Pernambuco, Brazil

N. T. de Pontes Filho · S. B. de Araújo
Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, Pernambuco, Brazil

Published online: 07 July 2012

group was further subdivided into four subgroups: NAC, PZQ, NAC+PZQ and control (without treatment). Oral administration of NAC (200 mg/kg/day) was carried out on the first day after infection for the acute phase and on the 45th for the intermediate and chronic phases for 59 and 45, 75 days, respectively. PZQ (100 mg/kg/day), was given orally by gavage from the 45th to 49th day after infection. Histopathological analysis of liver tissue provided evidence that combined NAC+PZQ treatment reduced the development of granulomas observed in the chronic phase. Animals treated with NAC and/or PZQ showed a reduction in the size of granulomas and all those treated with NAC exhibited a lower degree of fibrosis. In all groups, NAC decreased the synthesis of interferon- γ and nitric oxide, while increasing the levels of interleukin-10, but it did not influence the production of interleukin-4. On the whole, NAC treatment induced an immunomodulatory effect and reduced liver damage during the granulomatous inflammation in *S. mansoni*-infected mice.

Introduction

Schistosomiasis is a parasitic infection caused by the trematode species of helminth of the genus *Schistosoma*, which is found throughout the world. It is present in 76 countries and territories, where approximately 300 million people are infected and 20 million of these develop severe chronic complications that result in about 500,000 deaths per year (Chitsulo et al. 2000; Bina and Prata 2003; Blanchard 2004).

The lack of vaccines and the ineffectiveness of public health interventions made chemotherapy the only available

APÊNDICE D ñ Hydrogel of sugarcane molasses as carrier of one morphogenetic protein in the reconstruction of critical bone defects in rats

ARTIGO PUBLICADO

Título: Hydrogel of sugarcane molasses as carrier of one morphogenetic protein in the reconstruction of critical bone defects in rats

Autores: Martinho Dinoá Medeiros Júnior, Elaine Judite de Amorim Carvalho, Ivson Souza Catunda, Sidcley Bernardino-Araújo, José Lamartine de Andrade Aguiar

Revista: Acta Cirurgica Brasileira

Cities per doc (SCOPUS):

Impact Factor (web of Science): 0.661

1 ñ ORIGINAL ARTICLE MODELS, BIOLOGICAL

Hydrogel of polysaccharide of sugarcane molasses as carrier of bone morphogenetic protein in the reconstruction of critical bone defects in rats¹

Martinho Dinoá Medeiros Júnior^I, Elaine Judite de Amorim Carvalho^{II}, Ivson Souza Catunda^{III}, Sidcley Bernardino-Araújo^{IV}, José Lamartine de Andrade Aguiar^V

^IFellow PhD degree, Postgraduate Program in Surgery, UFPE, Recife-PE, Brazil. Main author. Conception, design, acquisition and interpretation of data; manuscript writing.

^{II}Associate Professor, Maxillofacial Surgery and Prosthesis Department, UFPE, Recife-PE, Brazil. Analysis and interpretation of data, histopathological examinations.

^{III}Assistant Professor, Maxillofacial Surgery Department, UFPE, Recife-PE, Brazil. Acquisition and interpretation of data.

^{IV}Biologist, Department of Pathology and Laboratory of Immunopathology KeizoAssami, UFPE, Recife-PE, Brazil. Histological techniques.

^V Associate Professor, Department of Surgery, Postgraduate Program in Surgery, UFPE, Recife-PE, Brazil. Conception, design and supervised all phases of the study, manuscript writing.

ABSTRACT

PURPOSE: To evaluate the benefit of using carriers such as the biopolymer gel (hidrogel of polysaccharide of sugarcane molasses) associated with the bone morphogenetic proteins (BMPs) in the repair of critical bone defects in calvaria of Wistar rats. **METHODS:** Forty-two rats were submitted to a surgical calvaria bone defects. These animals were divided into two experimental groups, positive control group and negative control group. The Group I the calvaria defect was filled up with biopolymer gel, biological membrane, BMP and lyophilized graft. The Group II was treated with biopolymer gel, BMP and lyophilized graft. And the group III (positive control group) was treated with BMP, lyophilized graft and biological membrane. In the negative control group (Group IV) a defect was made in the rat calvaria and the animals were sacrificed immediately after the surgery. The animals of experimental groups and positive control group were slaughtered after subsequent periods of 90 and 180 days. In these periods, the histological analysis and image assessment by cone beam tomographic imaging were obtained.

RESULTS: There was highest bone tissue formation with statistically significant results in the groups that associated biopolymer gel and membrane (Group I), followed by the group III (BMP, lyophilized graft and biological membrane). The lower bone formation occurred in the group not using the sugarcane biopolymer gel (Group II). The radiolucent areas of the analyzes of 180 days among the groups studied were respectively, 14.98 mm², 26.65 mm² and 35.81 mm².

CONCLUSION: The biopolymer gel showed to be an excellent bone morphogenetic protein carrier, probably by facilitating the controlled release of these proteins in the process of bone repair.

Key words: Bone Regeneration. Bone Transplantation. Bone Morphogenetic Proteins. Rats.

ANEXO A ã Carta de aprovação do Comitê de Ética

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 08 de maio de 2008

Ofício nº 25/08

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE
Para: **Prof. Francisc de Assis Cordeiro Barbosa**
Departamento de Cirurgia - CCS
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.005297/2008-87

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado **"REAÇÕES DOS TECIDOS PERIOCULARES A IMPLANTAÇÃO DE PRÓTESE CONSTITUÍDA DO BIOPOLÍMERO DE CANA DE AÇÚCAR: MODELO EXPERIMENTAL EM COELHOS"**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEAA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Maria Teresa Sousa



Prof.ª Maria Teresa Sousa de A. Catão

Coordenadora da Área III/CCB

SIAPE: 1130819

RECEBIDO EM 08/05/2008

NOME: FRANCISCO DE ASSIS CORDEIRO BARBOSA

ASSINATURA:

[Handwritten signature]

CCB: Integrar para desenvolver

