

# TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Uso de próteses oculares de  
polietileno granulado como  
biomaterial em cavidades  
anoftálmicas**

Gustavo Mendes

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon

Botucatu

2010

**Gustavo Mendes**

**Uso de próteses oculares de  
polietileno granulado como  
biomaterial em cavidades  
anoftálmicas**

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon

**Botucatu**

**2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Mendes, Gustavo.

Uso de próteses oculares de polietileno granulado como biomaterial em  
cavidades anoftálmicas / Gustavo Mendes. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado – Física Médica) – Instituto de  
Biotecnologia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Cláudia Helena Pellizzon

Capes: 31302017

1. Coelho. 2. Leporidae. 3. Olhos – Cirurgia. 4. Implantes artificiais.

Palavras-chave: Biomaterial; Cavidade anoftálmica; Coelhos; Polietileno  
granulado.

A Deus, por SEMPRE criar condições para que eu chegasse até aqui fosse além. Por toda sabedoria, pela proteção e por me colocar sempre no melhor caminho.

Aos meu pais Gilberto Mendes e Maria Aparecida Gonçalves Mendes e à minha irmã Viviane Mendes, que são meu apoio, minha vida, meu TUDO, que sempre acreditaram, me ajudaram e tiveram muita fé em mim.

Aos meus “amigos-irmãos” que contribuíram pelo meu crescimento e fizeram tudo ser possível.

À minha orientadora que me deu essa oportunidade e que trabalhou muito para o sucesso deste trabalho e da minha formação.

À minha avó Joana Francisca da Rocha Mendes, por ter deixado ensinamentos para toda a vida, por ter me ensinado valores como respeito, humildade, verdade, vontade e amor. (*in memoriam*)

## DEDICO

## Agradecimentos

Ao Carlos, à Marta, à Mara, ao Vitor e ao Laia ambos do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, da Faculdade de Medicina de Botucatu, por todo trabalho realizado e toda ajuda sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Regina Kiomi Takahira pela ajuda com as análises bioquímicas, as quais provaram efetivamente a não toxicidade do material.

À Profa. Dra. Silvana Schellini, exímia em pesquisas utilizando próteses oculares, que contribuiu para um aumento significativo do nível deste trabalho.

À empresa Cloud Tecnologia Informação Ltda, pelo fornecimento das esferas que são as nossas “meninas dos olhos” e que se mostraram compatíveis e inovadoras.

Ao médico oftalmologista João Soranz Filho por ter realizado as cirurgias nos animais de maneira competente e de qualidade, a qual se refletiu diretamente no projeto. E por toda sua generosidade e atenção para com todos os colaboradores.

Aos meus irmãos de Botucatu: Éric Francisco Scolastici (Mulekã), Renato Bocamino Doro (Daycon), Rodrigo Sanchez Giarola (Rifle) e Thiago dos Santos Pinto (Fanta), por me fazerem felizes e melhor durante todo o tempo em que passei nessa aqui.

Ao meu amigo Alexandre Tanimoto (Kitasato), à Bianca Gregório e ao Jean Felipe Marques por todas as risadas ao longo do estágio.

Um agradecimento especial à Ariane Leite Rozza por toda ajuda, inclusive por ter se disponibilizado à corrigir esta monografia e por toda atenção e carinho.

E à minha amiga e orientadora Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon por toda ajuda, paciência e competência que fazem dela essa pessoa amável, divertida e idolatrada. Não encontro aqui palavras para descrever o quanto ela representa para

mim. Agradeço a ela por ter me dado essa oportunidade de aprendizado e de crescimento tanto profissional como pessoal. Com certeza foi dela a maior parte executada neste projeto.

<b>1</b>	<b>Sumário</b>	
<b>2</b>	<b>Introdução</b> .....	1
<b>3</b>	<b>Objetivos</b> .....	5
<b>4</b>	<b>Materiais e Métodos</b> .....	6
4.1	Aprovação do comitê de ética .....	6
4.2	Implante.....	6
4.3	Interação implante com os tecidos biológicos- estudo preliminar .....	6
4.4	Animais.....	8
4.5	Delineamento experimental.....	8
4.6	Procedimento experimental.....	9
4.6.1	Exames Bioquímicos.....	10
4.6.2	Exames Morfológicos .....	11
4.7	Análise Estatística.....	12
4.8	<b>Resultados</b> .....	13
4.8.3	Análises bioquímicas.....	16
4.8.4	Análises morfológicas .....	19
4.9	<b>Discussão</b> .....	22
4.10	<b>Conclusão</b> .....	26
4.11	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	28

## 2 INTRODUÇÃO

A falta do globo ocular acarreta uma deformação progressiva, deformação da estética facial, que normalmente nos obriga a intervir cirurgicamente para restaurar a aparência do indivíduo que porventura perde seu olho. Perda essa que pode ser através de uma evisceração, ou seja, uma cirurgia na qual retiramos o “conteúdo” do globo ocular, preservando a esclera e em alguns casos, conserva-se também a córnea; portanto, a capa fibrosa do globo ocular fica mantida e em qualquer dessas situações a atrofia facial é iminente.

Apesar de toda a tecnológica dos dias de hoje, estamos distantes de uma solução prática, acessível economicamente e se possível definitiva, para nossos pacientes. Já a trajetória de vida necessita por motivos vários, de uma cirurgia de implantação de próteses orbitárias.

Dentre as cirurgias realizadas para a reparação da cavidade anoftálmica a enucleação é a mais agressiva, já que neste caso realizamos a retirada total do globo ocular, seccionando o nervo óptico e liberando os músculos que se inserem na parede escleral. Esta cirurgia apresenta um resultado menos eficiente que a evisceração, ou seja, cirurgia para a retirada somente do interior do globo ocular (Soares *et al.*, 1997).

A perda de um olho pode ser um evento traumático na vida de uma pessoa, resultando em problemas não somente clínicos, mas também emocionais. Pacientes com anoftalmia frequentemente apresentam transtornos psíquicos e/ou funcionais que dificultam sua readaptação aos meios social, profissional e familiar (Cabral *et al.*, 2008). Isso em função do grau de deformidade que pode se instalar, dependendo do tempo da realização da cirurgia, do tipo do trauma e também do tipo de cirurgia (Anderson *et al.*, 2002; Custer & Trinkaus, 2007).

A reposição do volume da cavidade orbital deve ser feita por preenchimento completo do volume e sempre que possível com um material que pode ser: autólogo, onde um material obtido do próprio indivíduo, como por exemplo, fascia, gordura e osso; homólogo, onde o implante é de um indivíduo doador da mesma espécie; heterólogo, quando é implantado um tecido originário de animais de espécie diferente do indivíduo receptor; e aloplástica, onde se implanta diferentes tipos de materiais como metais, elementos sintéticos que podem ser implantados sem rejeição pelo organismo. O tempo para se colocar o implante deve ser o mais rápido possível; ou seja, de preferência no mesmo tempo cirúrgico da evisceração ou enucleação, procurando evitar a “síndrome da cavidade anoftálmica” (enoftalmo, sulco palpebral superior profundo, ptose e flacidez da pálpebra inferior) (Sami *et al.*, 2007). Osborne *et al.* (1974) mostram a diferença entre indivíduos que foram enucleados antes dos 15 anos e não receberam próteses orbitárias, apresentando 15% a menos de desenvolvimento orbitário, comparados com os 8% de crescimento que apresentaram os que tiveram o implante. Porém, não somente alterações em crianças levam a alteração da órbita. Nos adultos com comprometimento do conteúdo orbitário, da mesma forma, encontramos contração dos tecidos orbitários e periorbitários agravados pelos casos em que encontramos infecção orbitária avançada (Hatal, 1987).

As tentativas de recompor estética e fisiologicamente as cavidades orbitárias remontam 2000 a.C., onde egípcios cobriam cavidades orbitárias com próteses orbitárias externas confeccionadas com prata e pedras preciosas (Tonkelaar *et al.*, 1991). Da mesma forma, gregos e após romanos utilizaram materiais diversos para confecção de olhos das suas estátuas.

Na evolução destes artefatos, encontramos-os no Egito (283-247 d.C.), já com variações para serem usadas sobre a pálpebra, e também sob a pálpebra. Em 1510, encontramos uma descrição mais sofisticada das antigas próteses, para serem

adaptadas sobre as pálpebras, sendo que Hazard-Mirault (1755-1822) modificaram as próteses de Paré, as quais eram confeccionadas em couro por uma modelagem em gesso, sendo confeccionadas em metal, vidro, e colocadas sobre os olhos atroficos. (Tonkelaar *et al.*,1991).

Com a evolução dos procedimentos da enucleação e evisceração a partir do século XIX, as próteses passaram a ser adaptadas dentro da cavidade orbitária. O volume ainda era muito grande devido a enucleação ou evisceração, sem reposição do conteúdo.

Uma contribuição importante veio com as esferas de vidro de Mules preenchendo as cavidades evisceradas, o que melhorou significativamente as próteses e a estética das órbitas. Uma variação foi criada por Frost, com o implante da cápsula de Tenon (Soll, 1987).

Na cronologia da evolução dos implantes, aparecem com os irmãos Müller, com um tipo de esfera para preenchimento da cavidade muito leve para os padrões da época (Tonkelaar *et al.*, 1991) passando a ser muito utilizada. Com o início da 2ª Guerra Mundial, o trabalho da fábrica de implantes foi interrompido devido a bombardeios. Em contrapartida, o número de mutilados aumentou, levando a procura de alternativas que viessem a minimizar o impacto da mutilação. Apareceram então, os implantes metálicos (Ruedemann), o polimetilmetacrilato (PMMA) e o silicone (Hornblass *et al.*, 1995).

O PMMA, ainda muito usado, é um material sintético, leve, barato e inerte, com baixo índice de rejeição, semelhante às esferas de vidro. É classificado como um material biocompatível, sendo o implante mais utilizado no século passado. Com variadas técnicas associadas as cirurgias, encontra-se grande quantidade de bons resultados quando associado a alguns materiais autólogos ou heterólogos utilizados

para revestir a esfera lisa de PMMA, o que diminui a possibilidade de extrusão com melhor aceitação pela cavidade receptora (Rubin *et al.*, 1994) .

Dentre os materiais para implante orbital o conceito de biointegráveis (Perry, 1989) passou a ser bastante interessante. A Hidroxiapatita (HA) natural é utilizada amplamente pela odontologia e na ortopedistas, em função da capacidade de integração ao organismo receptor, através de uma invasão fibrosa altamente vascularizada, diminuindo a possibilidade de extrusão, temida nos implantes lisos biocompatíveis (Siros *et al.*,1998).

Outro material utilizado pelos padrões americanos, segundo Jordan e cols. (2003), é o “coral marinho”, mas ainda continuamos com os problemas em relação a esses em função de ser uma fonte esgotável e de custo elevado (Goiato *et al.*, 2010).

Houve então, o desenvolvimento da Hidroxiapatita sintética, com características químicas e funcionais semelhantes a Hidroxiapatita natural (Constantino *et al.*, 1992). Schellini *et al.* (1998) mostraram que o carbonato de cálcio presente na Hidroxiapatita natural ou sintética pode provocar fagocitose e metaplasia óssea no receptor, dados importantes pois indicam a biointegração com motilidade das próteses.

Outro material surge no cenário dos implantes, o Polietileno Poroso (PP); constituído de polietileno de ultra alto peso molecular, descrito na literatura como não tóxico e inerte (Rubin, 1983; Warnen, 1990). O implante de PP é mais barato, feito de materiais que não causam dano ambiental e sua biocompatibilidade e complicações são comparáveis ao implante de HA (Goiato *et al.*, 2010).

Além disso, ao comparar ambos os implantes, Sadiq *et al.* (2008) mostraram que o implante de PP possui melhor mobilidade pelo fato de que pode ser suturado junto ao músculo, o que resulta em uma melhor transmissão da contração e propicia a movimentação da prótese. O implante de PP pode ser utilizado com sucesso como

implante em cirurgia orbitária em cavidades anoftálmicas, com o mínimo de complicações. O material, PP, é bem tolerado, tem excelente biocompatibilidade, baixa taxa de infecção e de migração (Chen & Cui, 2006; Goiato *et al.*, 2010).

### **3** Objetivos

Desenvolver uma esfera de polietileno granulado de ultra-alto peso molecular, produzido com tecnologia nacional e baixo custo, para o uso de próteses orbitárias através de um modelo experimental, implantando-as em cavidade orbitária eviscerada de coelhos. O intuito é demonstrar sua viabilidade a fim de reparar tais cavidades com avaliações em diferentes momentos após sua implantação, bem como avaliar sua biocompatibilidade, verificando possíveis alterações celulares e de toxicidade.

## **4 Materiais e Métodos**

### **4.1 Aprovação do comitê de ética**

Todos os procedimentos foram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimental (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA), protocolo nº 77/08-CEEA/IBB UNESP.

### **4.2 Implante**

Foram utilizados implantes esféricos de polietileno granulado de ultra-alto peso molecular. A empresa que forneceu e produziu as esferas foi a *Cloud Tecnologia Informação Ltda*, localizada no município de Sorocaba, estado de São Paulo. Os implantes utilizados possuíam porosidade diferenciada com definição da empresa de 00 à 03. Os implantes apresentam as seguintes características físico-químicas por composto: pó polietileno linear de média densidade de ultra alto peso molecular  $2 \times 10^6$  g/mol,, classificado como não tóxico e inerte, com ponto de fusão entre 125 e 135 °C, com densidade entre 0,920- 0,935 g/cm<sup>3</sup> e não solúvel.

### **4.3 Interação implante com os tecidos biológicos - estudo preliminar**

Para o procedimento de verificação da interação do implante com os tecidos biológicos foi feito um estudo preliminar.

Para tanto foram utilizados ratos linhagem Wistar machos adultos que foram selecionados aleatoriamente e separados em dois grupos de modo que um grupo

permanecesse durante 7 (sete) dias com o implante no dorso e o outro, durante 14 (catorze) dias (Fig 1).



**Figura 1:** *Fotografias representativas de interação tecidual com os implantes nos estudos preliminares em ratos onde o material de diferentes porosidades permaneceu 14 dias. Em A região da implantação; em B porosidade 00; em C porosidade 01; em D porosidade 02; em E porosidade 03.*

Quatro tipos de implantes foram utilizados nesse teste em que cada tipo possuía um grau de porosidade. Em cada rato foram inseridos dois tipos de implante

de maneira que todos os tipos permanecessem durante os períodos estipulados. O tipo de placa que apresentou melhores resultados foi então, a utilizada para este projeto.

#### 4.4 Animais

Foram utilizados 48 coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, de ambos os sexos e idade entre 3 (três) e 6 (seis) meses, provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu.

Os coelhos foram subdivididos aleatoriamente em quatro grupos, conforme o momento de sacrifício. Cada grupo com 12 animais, dos quais 10 receberam o implante e dois, foram considerados como grupo controle, sendo eviscerados e não recebendo nenhum tipo de implante.

#### 4.5 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em grupos experimentais os quais foram sacrificados em diferentes tempos experimentais com 15, 30, 90 e 180 dias.

No momento do início do experimento todos os animais foram submetidos a retiradas de sangue para análise de toxicidade. Esse período foi denominado de Momento  $P_0$ .

Os coelhos com implante na cavidade eviscerada após o que, foram sacrificados e que se coletou novamente sangue para exames bioquímicos, foram classificados nos seguintes momentos:

- **Momento  $P_1$ :** onde os animais foram sacrificados com 15 dias pós implante;

- **Momento P<sub>2</sub>**: onde os animais foram sacrificados com 30 dias pós implante;
- **Momento P<sub>3</sub>**: onde os animais foram sacrificados com 90 dias pós implante;
- **Momento P<sub>4</sub>**: onde os animais foram sacrificados com 180 dias pós implante.

Foram utilizados como controle, os animais que tiveram a cavidade orbital direita evisceradas no P<sub>0</sub> e sacrificados nos mesmos períodos descritos anteriormente para cada grupo.

#### **4.6 Procedimento experimental**

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP sendo realizados sob condições de assepsia e anti-sepsia, conforme descrito a seguir.

Roteiro do procedimento cirúrgico:

- a) Os animais previamente divididos nos diferentes tempos experimentais, foram anestesiados com Zoletil® na dose de 15mg/kg associada com Xilazina 0,015mg/kg;
- b) De todos os animais, previamente anestesiados, foram retirados sangue da veia auricular para testes de toxicidades;
- c) Os animais foram submetidos assepsia e antisepsia do olho direito, com colocação do campo oftálmico e blefarostato;
- d) Realizado incisão na conjuntiva bulbar superior.

- e) Foi realizada a abertura córneo-escleral foi feita com bisturi lâmina 15;
- f) Foi feita a evisceração do conteúdo do olho direito e colocação das esferas conforme grupo experimental e suturado da incisão foi feito com pontos de Mersilene 6-0;
- g) Os animais foram analisados diariamente por observação feita sob a luz ambiente analisando os sinais que denotassem alterações sistêmicas ou no sítio operatório. A saúde geral do animal foi estimada pela atividade, apetite, atitude na gaiola e pesagens semanais. Uma atenção especial foi dada nos locais da região orbitária direita, para avaliar se houve a presença de sinais inflamatórios e/ou possível infecção, traduzida por secreção, deiscência de sutura conjuntival ou outros sinais possíveis e presentes na face, além da observação da presença da esfera implantada.
- h) Transcorrido o tempo experimental nos momentos P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> e P<sub>4</sub>, foi retirado o sangue dos animais pela veia auricular para análise bioquímica e posteriormente foram submetidos a uma *overdose* de anestésico Xilazina a 0,10mg/kg .
- i) Após a morte do animal, os olhos direitos foram enucleados e colocados em fixador histológico.

#### **4.6.1 Exames Bioquímicos**

As amostras de sangue coletadas imediatamente antes do início da cirurgia e do sacrifício foram processadas no Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de

Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu/SP, Departamento de Clínica Veterinária.

Para cada amostra de sangue retirado antes dos experimentos e posterior ao tempo experimental, realizaram-se exames para verificação de possível repercussão sistêmica decorrente da implantação na cavidade orbitária. Foram feitos os seguintes exames para verificação da função hepática: AST (Aspartato Aminotransferase) e ALT (Alanina Aminotransferase), antigamente chamadas de TGO (Transaminase Glutâmica Oxalacética) e TGP (Transaminase Glutâmica Pirúvica), respectivamente; FA (Fosfatase Alcalina) - usada também para verificar função cardíaca - e GGT (Gama-glutamil transferase). O exame de CPK (Creatinina Fosfoquinase) foi feito tanto para verificação da função renal quanto da cardíaca. E, para verificar a função renal, também foi feito o exame de ureia (Kaneko *et al.*, 2008).

#### **4.6.2 Exames Morfológicos**

##### **4.6.2.1 *Processamento do Material***

Os olhos enucleados foram previamente fixados em formol tamponado 10% por 24 horas a 4 °C, onde foram processados no auto-técnico LEICA TP 1020 (Alemanha), onde as amostras foram colocadas em série crescente de álcool 80% a 100%, diafanizados em xilol em 3 banhos. Logo após, houve a infusão de parafina a temperatura de 50 °C a 60 °C em cada um dos banhos estava programado para ter duração de 1 hora. Em seguida, as amostras foram levadas ao inclusor LEICA EG 1160 (Alemanha) para inclusão em paraplaste e após isso, foram cortadas em micrótomo rotativo LEICA RM 2155 (Alemanha). As amostras foram cortadas com 5 µm em

lâminas histológicas KNITTEL (Alemanha), permanecendo em estufa a 60 °C por aproximadamente por 1 hora, para aderência da amostra a lâmina.

As Lâminas com as amostras foram coradas no Auto-Stainer XL LEICA (Alemanha) com a técnica de Hematoxilina e Eosina (Behmer *et al.*, 1976) e colocadas as lamínulas Knittel para no aparelho LEICA CV 5000.

#### 4.6.2.2 *Análise microscópica*

Com as laminas histológicas previamente coradas foram avaliados os seguintes em microscópio LMBD LEICA acoplado ao software LEICA Q-Win onde foram analisadas reparação tecidual inflamatória (tipo, localização e intensidade da reação) encontrada nos tecidos ao redor do implante. Procurou-se conhecer a integração celular como implante dando uma maior ênfase no estudo das células: neutrófilos e eosinófilos, após os tempos de experimentação anteriormente descritos.

### 4.7 **Análise Estatística**

O teste estatístico utilizado foi de **Wilcoxon Rank Sum Test** (equivalente ao teste U de Mann-Whitney) utilizando o programa **R** (versão 2.11.1 (31/05/2010)). Teste este não-paramétrico alternativo ao teste *t-Student* para comparar as médias de duas amostras independentes e aleatórias. (CORDER; FOREMAN, 2009). O teste de hipóteses foi:

- $H_0$ : as duas amostras têm distribuições idênticas e
- $H_1$ : as duas amostras têm distribuições diferentes.

## **4.8 RESULTADOS**

### **4.8.1 Resultado de interação tecidual com os implantes - Resultados de estudos preliminares**

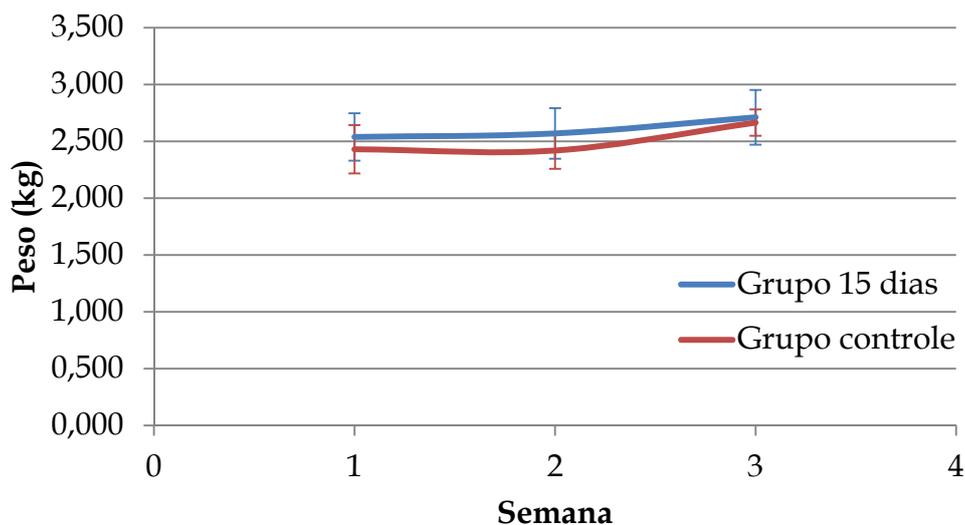
No primeiro estudo da interação biológica com o implante realizamos o piloto com ratos. Em cada rato foram inseridos dois tipos de implante, com porosidade diferenciada, de maneira que todos os tipos permanecessem durante os períodos de 7 e 14 dias.

Os quatro implantes fornecidos pela empresa apresentam o mesmo tipo de comportamento quando implantado no subcutâneo de ratos, não apresentando qualquer tipo de alteração. Em função desse resultado optamos pelo implante 00 para a continuidade dos experimentos.

### **4.8.2 Uso de próteses orbitárias para reparo de cavidades anoftálmicas**

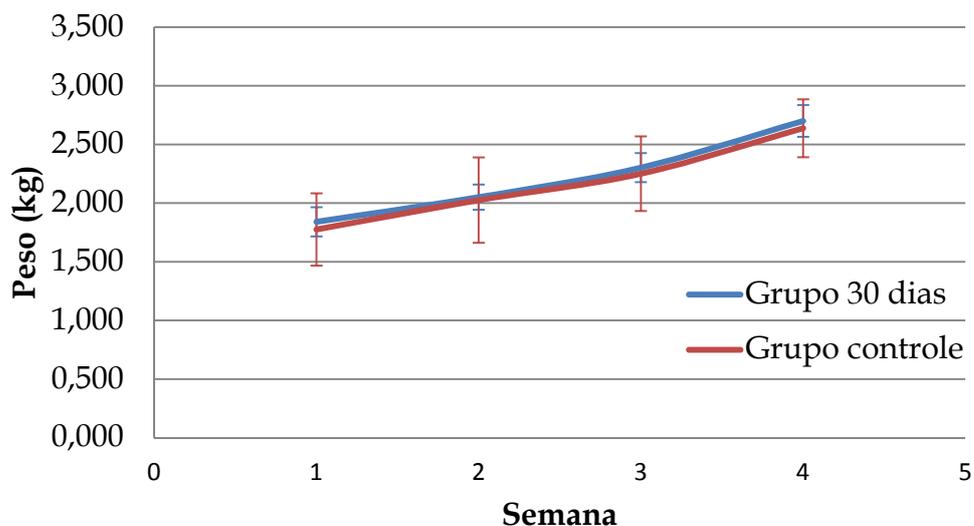
#### **4.8.2.1 *Peso dos animais após o implante***

No *gráfico 1* observa-se a variação do peso dos coelhos do grupo de 15 dias ao longo do tempo, os animais apresentaram o mesmo padrão de ganho de peso.



**Gráfico 1:** Comparação da variação média dos pesos dos coelhos do grupo de 15 dias com o grupo controle em relação ao tempo. Dados expressos em média e desvio padrão. Wilcoxon Rank Sum Test:  $p = 0,6857$ ,  $W = 10$ .

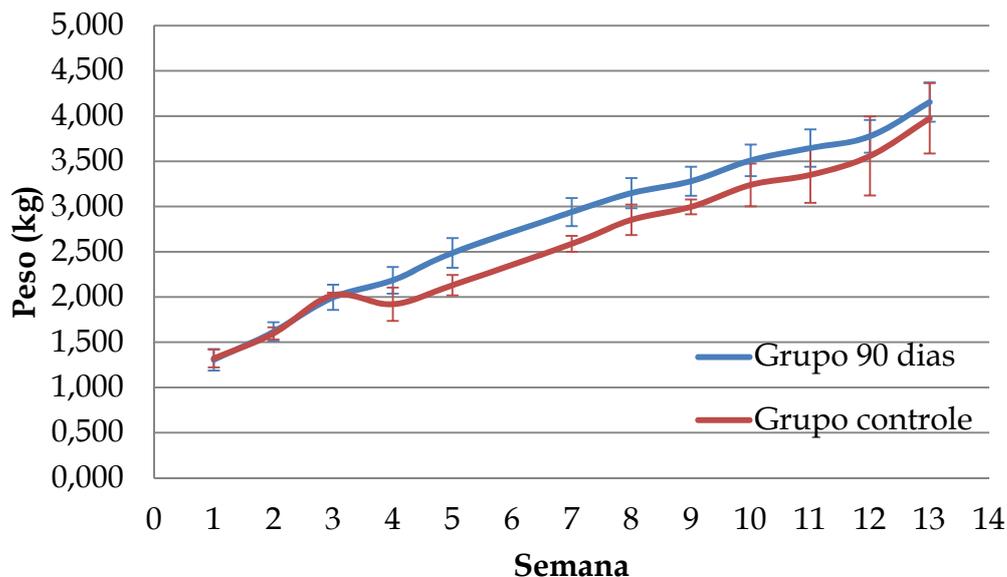
Aos 30 dias de permanência com o implante, o padrão de ganho de peso foi muito semelhante ao grupo controle não havendo alterações, esses dados podem ser observados no *gráfico 2*.



**Gráfico 2:** Comparação da variação média dos pesos dos coelhos do grupo de 30 dias com o

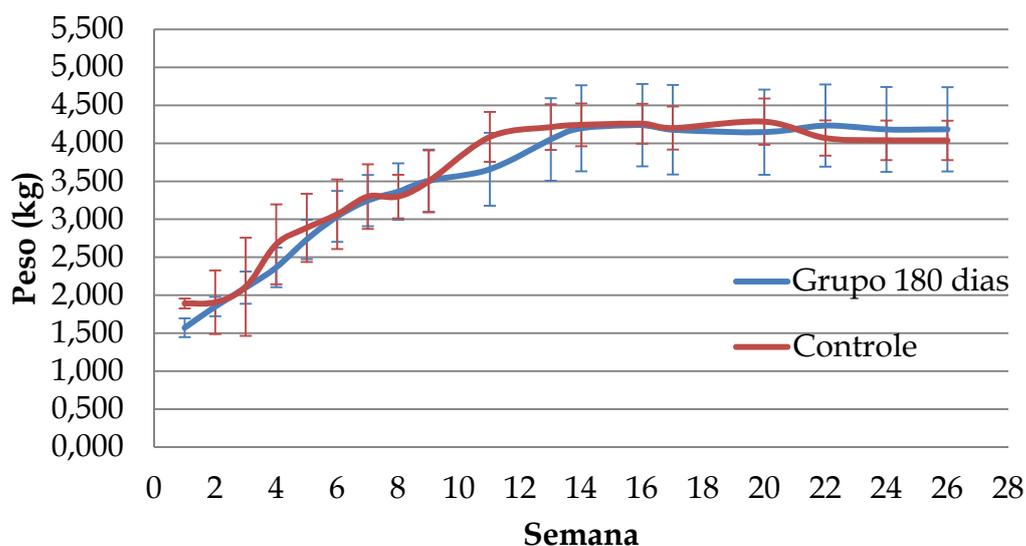
grupo controle em relação ao tempo. Dados expressos em média e desvio padrão. Wilcoxon Rank Sum Test:  $p = 0,6991$ ,  $W = 21$ .

No padrão de crescimento corporal apresentado pelo grupo de 90 dias, não houve diferença estatística sobre o grupo controle.



**Gráfico 3:** Comparação da variação média dos pesos dos coelhos do grupo de 90 dias com o grupo controle em relação ao tempo. Dados expressos em média e desvio padrão. Wilcoxon Rank Sum Test:  $p = 0,5512$ ,  $W = 83$ .

Com 180 dias após a implantação, os animais submetidos ao implante e do grupo controle apresentaram um padrão de crescimento idêntico, dado esse corroborado pelo teste de hipótese realizado (*gráfico 4*).



**Gráfico 4:** Comparação da variação média dos pesos dos coelhos do grupo de 180 dias com o grupo controle em relação ao tempo. Dados expressos em média e desvio padrão. Wilcoxon Rank Sum Test:  $p = 0,4963$ ,  $W = 140$ .

Esse resultado permite inferir que o implante não altera o padrão de crescimento dos animais, indicativo clínico importante para esse modelo experimental.

#### 4.8.3 Análises bioquímicas

Os resultados dos dados de toxicidade feitos por exames de sangue do grupo 15 dias estão contidos na *tabela 1*. Os dados não foram estatisticamente diferentes, sendo que para todo teste *t* realizado em cada exame,  $p > 0,05$ .

**Tabela 1:** Resultado do exame de sangue das amostras coletadas imediatamente antes da cirurgia (*inicial*) e no momento do sacrifício (*final*) para o grupo 15 dias. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Teste t,  $p > 0,05$ .

Exame	Inicial		Final	
	Grupo 15 dias	Controle	Grupo 15 dias	Controle
Ureia (mg/dl)	32,6 $\pm$ 5,5	31,8 $\pm$ 6,5	41,3 $\pm$ 16,2	43,6 $\pm$ 6,4
Creatinina (mg/dl)	0,9 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,1
ALT (U/l)	21,1 $\pm$ 12,0	21,7 $\pm$ 8,5	18,2 $\pm$ 13,5	14,0 $\pm$ 1,4
AST (U/l)	20,0 $\pm$ 13,4	17,7 $\pm$ 5,8	14,9 $\pm$ 5,2	18,0 $\pm$ 1,4
FA (U/l)	139,3 $\pm$ 34,1	172,7 $\pm$ 41,4	128,1 $\pm$ 22,1	149,5 $\pm$ 27,7
GGT (U/l)	8,6 $\pm$ 4,1	7,7 $\pm$ 0,6	13,2 $\pm$ 3,8	13,0 $\pm$ 1,4

Para o grupo de 30 dias, os resultados estão representados na **tabela 2**. Pode ser observado que dentre os resultados do teste t, apenas os denotados por asterisco tiveram  $p < 0,05$ .

**Tabela 2:** Resultado do exame de sangue das amostras coletadas imediatamente antes da cirurgia (*inicial*) e no momento do sacrifício (*final*) para o grupo 30 dias. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Exame	Inicial		Final	
	Grupo 30 dias	Controle	Grupo 30 dias	Controle
Ureia (mg/dl)	40,1 $\pm$ 4,1*	34,8 $\pm$ 0,1*	49,5 $\pm$ 9,5	47,1 $\pm$ 0,8
Creatinina (mg/dl)	1,0 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,2
ALT (U/l)	15,1 $\pm$ 3,9*	10,0 $\pm$ 0,1	19,8 $\pm$ 5,6	11,0 $\pm$ 1,4*

AST (U/l)	13,4 ± 4,8	15,0 ± 7,1	16,7 ± 5,1	13,5 ± 7,8
FA (U/l)	142,9 ± 35,9*	189,0 ± 8,5	140,1 ± 45,6	131,0 ± 33,9
GGT (U/l)	6,9 ± 1,1	7,5 ± 0,7	10,4 ± 3,4	12,0 ± 2,8

\* Teste t-Student,  $p < 0,05$ ,  $t < 4,654$ ,  $GL < 9$ .

Na *tabela 3* observa-se os resultados dos exames de sangue dos coelhos do grupo 90 dias, nesse período experimental não houve diferença estatisticamente significativa para qualquer parâmetro analisado.

**Tabela 3:** Resultado do exame de sangue das amostras coletadas imediatamente antes da cirurgia (inicial) e no momento do sacrifício (final) para o grupo 90 dias. Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste t,  $p > 0,05$ .

Exame	Inicial		Final	
	Grupo 90 dias	Controle	Grupo 90 dias	Controle
Ureia (mg/dl)	46,3 ± 6,6	40,9 ± 4,0	58,6 ± 15,5	59,4 ± 0,1
Creatinina (mg/dl)	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1
ALT (U/l)	22,0 ± 13,2	15,5 ± 2,1	19,4 ± 17,9	16,0 ± 0,1
AST (U/l)	8,4 ± 5,9	21,0 ± 1,4	17,4 ± 8,4	26,0 ± 7,1
FA (U/l)	171,6 ± 51,2	230,0 ± 49,5	94,3 ± 39,9	123,0 ± 38,2
GGT (U/l)	6,6 ± 1,8	9,0 ± 2,8	9,2 ± 1,8	11,5 ± 4,9

Com 180 dias após o implante de polietileno poroso os animais não apresentaram alterações significativas dos parâmetros de ureia, creatinina, ALT, AST, FA e GGT.

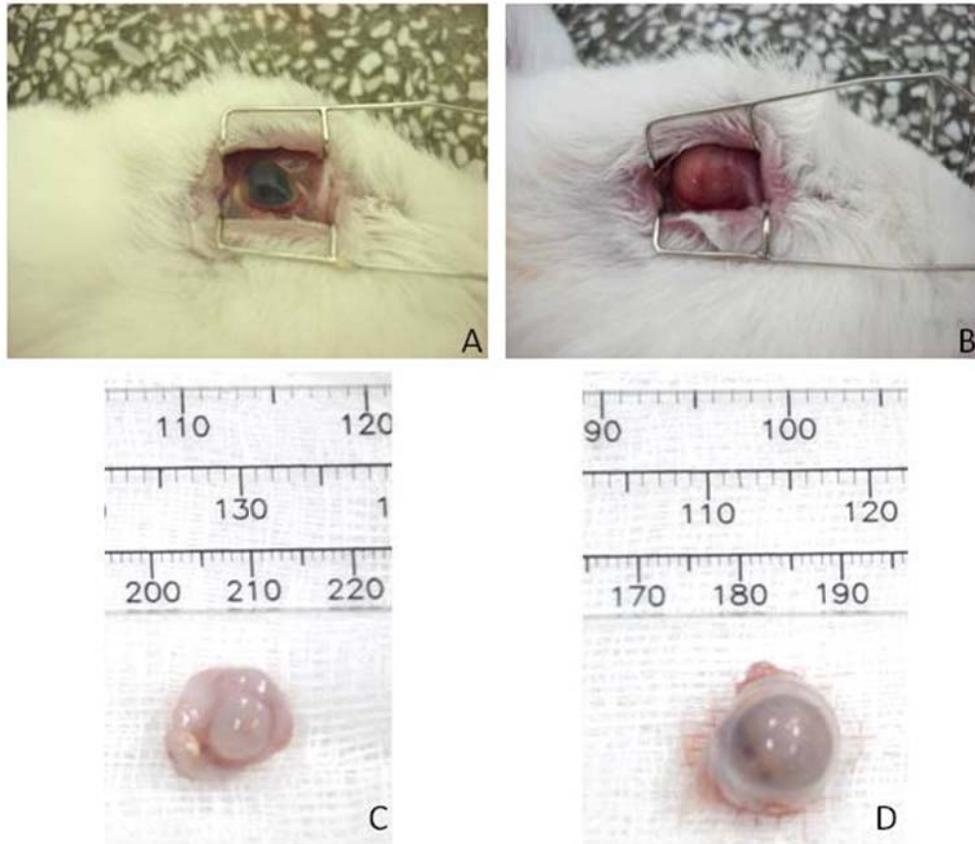
**Tabela 4:** Resultado do exame de sangue das amostras coletadas imediatamente antes da cirurgia (inicial) e no momento do sacrifício (final) para o grupo 180 dias. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Teste t,  $p > 0,05$ .

Exame	Inicial		Final	
	Grupo 180 dias	Controle	Grupo 180 dias	Controle
Ureia (mg/dl)	30,3 $\pm$ 4,6	34,9 $\pm$ 5,4	50,9 $\pm$ 11,2	50,3 $\pm$ 10,3
Creatinina (mg/dl)	0,7 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,2
ALT (U/l)	9,7 $\pm$ 2,9	8,7 $\pm$ 4,7	26,8 $\pm$ 14,6	20,7 $\pm$ 9,2
AST (U/l)	10,8 $\pm$ 2,4	13,3 $\pm$ 5,5	31,5 $\pm$ 11,3	24,0 $\pm$ 8,2
FA (U/l)	151,3 $\pm$ 19,1	122,3 $\pm$ 27,6	41,9 $\pm$ 18,6	30,3 $\pm$ 5,8
GGT (U/l)	8,1 $\pm$ 0,8	6,3 $\pm$ 1,5	12,4 $\pm$ 7,7	11,7 $\pm$ 1,5

Os dados das tabelas 1 a 4 mostram que o material implantado não apresenta alterações bioquímicas importantes, indicando que pode apresentar um grande potencial para estudos futuros para utilização em humanos. Esses dados são compatíveis com as observações clínicas de ganho de peso descritas anteriormente.

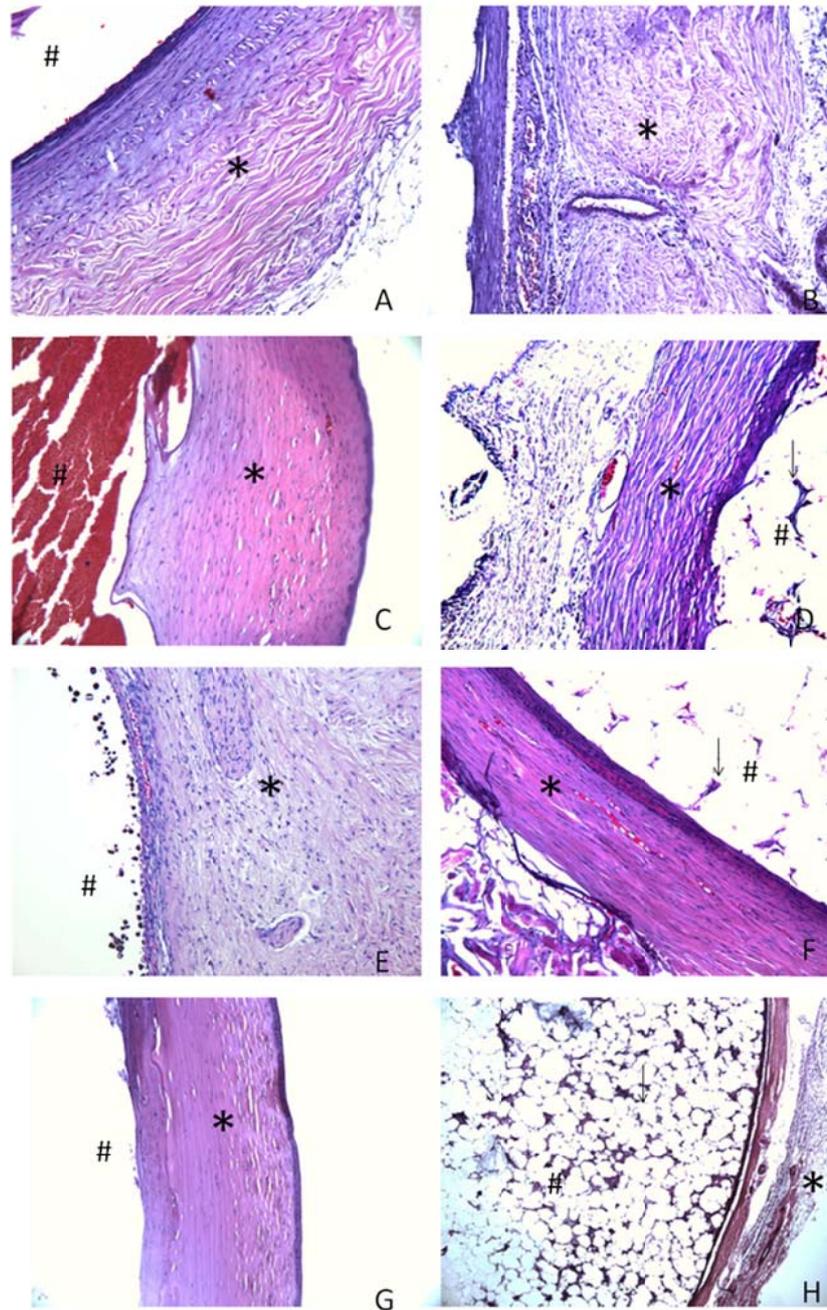
#### 4.8.4 Análises morfológicas

Os animais submetidos a enucleação da cavidade orbital e implantados com a prótese de PP apresentaram um bom desenvolvimento clínico e com reposição de volume adequada em todo período experimental, como pode ser observado na Fig. 2.



**Figura 2:** Fotografia dos olhos dos coelhos submetidos ao implante poroso após 180 dias da implantação. Em A, observa-se o olho do animal controle, sem a reparação do volume da cavidade após a enucleação, onde pode se notar uma alteração de volume da cavidade bastante significativa em C, quando comparada com a do animal submetido ao implante em B e D. Note que no animal submetido ao implante, B, tem um padrão de volume orbital mantido.

Quando analisada a interação da prótese com o tecido biológico do animal observa-se uma interação bastante satisfatória não sendo observados processos inflamatórios e alterações da esclera ao redor da cavidade. No interior do implante, pôde-se se notar a presença de tecido biológico promovendo o preenchimento (fig. 3).



**Figura 3:** Fotomicrografia dos olhos de coelhos submetidos à evisceração. Fotomicrografias A, C, E e G são dos olhos do grupo controle que foram eviscerados mas não submetidos a reposição da cavidade orbital. Na fotomicrografias B, D, F e H observa-se o material

dos olhos do grupo implantado. Onde \* é a região da esclera e # é a região da cavidade eviscerada. Note que os grupos implantados apresentam a presença de infiltração tissular (seta), sendo que as fotomicrografias A e B são do grupo com 15 dias após o implante, C e D com 30 dias, E e F com 90 dias e G e H com 180 dias.

#### 4.9 Discussão

Este estudo foi desenvolvido para verificação da interação da interação biológica ao implante de PP desenvolvido por uma indústria nacional para reposição de volume da cavidade orbital.

Estudos com um novo biomaterial, sendo estes definido como um implante que é colocado em contato com o tecido vivo com o objetivo de recompor alguma parte lesada, ou auxiliar a sua reparação (França *et. al.*, 2005), é fundamental para o uso ocular, uma vez que esse processo é traumático resultando em problemas não somente clínicos, mas também emocionais. Pacientes com anoftalmia frequentemente apresentam transtornos psíquicos e/ou funcionais que dificultam sua readaptação aos meios social, profissional e familiar (Cabral *et al.*, 2008).

Nesse estudo utilizamos um implante produzido de polietileno de ultra-alto peso molecular, elaborado exclusivamente para ser implantado em coelhos. As esferas implantadas apresentavam 10 mm de diâmetro, tamanho este considerado ideal para com isso, ser possível manter a córnea do animal (Shiratori *et al.*, 2005).

A escolha de coelhos, como modelo experimental, foi decorrente do fato de ser um animal interessante para esse estudo de cavidade orbital, pois apresenta rápido crescimento, órbita pequena, além de ser um animal de obtenção e manejo relativamente fáceis (Shiratori *et al.*, 2005).

Nossas esferas de PP, que é um polietileno de ultra-alto peso molecular, apresentaram no processo cirúrgico do implante a possibilidade de sutura juntamente com o ao tecido muscular extra-ocular, fator importante para promover motilidade da prótese (Chalasanani *et al.*, 2007; Sadiq *et al.* 2008). Com isso, é possível transmitir dessa forma, a movimentação ocular da prótese e dar a aparência de ser um olho funcional podendo ajudar no aspecto psicológico ao paciente (Cabral *et al.*, 2008)

Os dados obtidos nesse estudo corroboram a hipótese inicial elaborada sobre a utilização do polietileno granulado como um elemento de implante importante para órbita.

A preocupação com o processo inflamatório e em especial com a extrusão da prótese implantada é bastante recorrente na literatura (para revisão Custer *et al.*, 2007).

Goldberg *et.al.* (1994) avaliando a resposta inflamatória em cavidades de coelhos utilizando esferas de hidroxiapatita natural e Medpor® (polietileno), obtiveram uma maior resposta inflamatória nos animais implantados com hidroxiapatita natural. Esse dado indica que o polietileno tem uma reação mais simbiótica com o tecido biológico. Ranzani *et.al.* (1997) observaram células fagocíticas, como células gigantes de corpo estranho utilizando hidroxiapatita sintética em cavidade anoftálmica em ratos. O aspecto morfológico foi analisado de maneira qualitativo, e não foi observado qualquer tipo de alteração que permitisse a identificação de um processo inflamatório. Fato importante para interação do tecido com o biomaterial utilizado.

A extrusão dos implantes é uma preocupação clínica bastante importante. Custer *et al.* (2007) descreveram-na em relatos de casuística de extrusão. No caso do polietileno poroso, foi de 8,1% em pacientes. Outro material com alto índice de extrusão é a esfera de PMMA (polimetilmetacrilato). Entretanto, esta esfera é a mais utilizada no serviço de saúde e a que mais tempo de observação possui, uma vez que

vem sendo empregada há cerca de duas décadas. Essa extrusão pode estar relacionada com alterações do tipo contração da capa escleral no setor posterior, constatada em alguns dos pacientes durante o procedimento cirúrgico, com afinamento da mesma e da conjuntiva no setor anterior, levando à exposição da esfera (Schellini *et al.*, 2007).

O processo de extrusão é mais freqüentemente observado ao longo do tempo. Nesse estudo, no qual promovemos o implante em um máximo de 180 dias pós-implantação, não foi observado qualquer tipo de indicativo clínico de extrusão do material.

As análises bioquímicas realizadas avaliaram os níveis de Creatinina, ureia, ALT, AST, FA e GGT.

Órgãos com uma alta concentração de uma enzima têm o potencial para causar um grande aumento na atividade sérica da enzima devido à doença. Por exemplo, o gradiente de concentração intracelular para extracelular de alanina aminotransferase hepatocelular (ALT) é 100.000:1. Lesão dos hepatócitos, portanto, tem o potencial de causar acentuadamente maior a atividade de ALT no soro.

Quanto maior gradiente da concentração da enzima ou proteína marcadora entre a célula e o espaço intersticial, mais rápido é a translocação de significativas quantidades da enzima para o espaço intersticial e, finalmente, para o sangue. Da mesma forma, o fígado tem uma grande massa, aumentando assim, o potencial da atividade da ALT (Kaneko *et al.*, 2008). Dentre os resultados obtidos, pode-se observar que para o grupo 30 dias houve uma alteração dos níveis dessa enzima no grupo experimental no início e no grupo controle no final. O uso da prótese não comprometeu essa variação uma vez que no início não havia sua implantação para ambos os grupos e muito menos para o grupo controle no final do período de estudo.

As determinações séricas AST fazem parte de muitos perfis bioquímicos devido à sua sensibilidade relativamente alta para a detecção de lesão hepatocelular, lesão do

miócito e à sua estabilidade no soro (Kaneko *et al.*, 2008). Dentre os níveis de AST analisados, não houve alterações significativamente estatísticas quando comparados os grupos controle e experimental para todos os tempos de experimentação.

A localização das enzimas celulares relativas ao sangue, urina ou outros fluidos é um fator significativamente determinante. Especialmente se um aumento na atividade da enzima ocorre, sua liberação pode ser encontrada em fluidos. Um exemplo bem conhecido é o da gama-glutamilttransferase tubular renal (GGT), localizada na superfície luminal de células epiteliais tubulares renais. Estas lesões nas células resultam na liberação da gama GT na urina mas não no sangue.

Da mesma forma, a fosfatase alcalina (FA), localizada na superfície luminal dos enterócitos, é perdida para o lúmen intestinal em vez do sangue quando há lesões do enterócito. FA hepatocelular, entretanto, com atividade sobre ambas superfícies biliares canalicular e senoidal, pode ser aumentada tanto na bile como no sangue.

Entretanto, a FA e GGT, quando ligadas à superfície externa das membranas celulares, são liberadas a partir de células do sangue por mecanismos distintos de enzimas derivadas de citoplasma (Kaneko *et al.*, 2008). Dentre essas enzimas, houve uma alteração apenas da FA para o grupo experimental de 30 dias no início antes da cirurgia, cuja causa claramente não pode ser atribuída ao uso da prótese, uma vez que o metabolismo de FA tem uma origem importante na medula óssea, além da hepática, especialmente em animais jovens (Takahira comunicação pessoal).

A enzima mais utilizada no soro para a determinação de doenças neuromusculares de animais domésticos é creatina quinase (CK), anteriormente chamada de creatina fosfoquinase (CPK). No músculo, esta enzima fornece ATP para a contração por fosforilação do ADP de creatina fosfato. A análise de tecidos de humanos indica que as atividades significativas de CK estão presentes no músculo esquelético, miocárdio e cérebro, com poucas quantidades no trato gastrointestinal,

útero, bexiga, rins e tireóide. Os valores normais para a atividade de CK variam de acordo com a atividade física, moderação, idade e sexo (Kaneko *et al.*, 2008). Não houve alterações dos níveis dessa enzima em nenhum dos casos.

A creatinina sérica é o marcador mais usado para o rastreamento da “disfunção renal” (Lessa, 2004). Ela é aumentada em insuficiência renal crônica e aguda, e também em algumas condições que não envolvem diretamente o rim. É o teste mais utilizado para diagnóstico e monitoramento da doença renal em humanos e animais de patologia clínica. Em coelhos implantados com quitosona porosa com cavidade eviscerada houve uma alteração dos níveis dessa no 7º dia após a cirurgia (Brito, 2008). Nesse estudo não houve alteração dos níveis de creatinina durante o tempo experimental.

A ureia é também utilizada frequentemente para a determinação da função renal, mas está sujeita aos mais numerosos fatores extra-renais de variação. Estas moléculas são quase totalmente eliminadas por filtração glomerular, mas no caso de insuficiência renal sua concentração plasmática aumenta (Kaneko *et al.*, 2008). Nos testes realizados houve alteração na ureia inicial dos grupos experimentais e controle. Entretanto certamente a causa não foi a prótese, uma vez que o sangue foi retirado antes mesmo da cirurgia.

#### **4.10 Conclusão**

Um aspecto importante para o estudo foi a verificação do peso corporal dos animais submetidos ao implante. No nosso estudo, verificamos que o processo de desenvolvimento corporal dos animais eviscerados e dos animais eviscerados e implantados com as nossas esferas testes foi muito semelhante. O mesmo ocorreu quando analisamos o sangue para elementos de toxicidade renal, cardíaca e hepática.

Esses dados são pouco discutidos na literatura, entretanto é um processo fundamental para nortear futuros exames clínicos.

Na análise histológica não houve recorrência de células inflamatórias no 15º dia e a partir do 30º dia, houve um aspecto morfológico muito semelhante da região da coroide e da esclera nos dois grupos: experimental e controle, e presença de infiltrado tissular neoformado no interior dos poros do implante ocular.

#### 4.11 Referências Bibliográficas

- BOTELHO, N. L. P.; VOLPINI, M.; MOURA, E. M. Aspectos psicológicos em usuários de prótese ocular. *Arq Bras Oftalmol*, São Paulo, v. 66, p. 637-646, sept./oct. 2003.
- CABRAL, L. G. M.; MARTELLI JÚNIOR, H.; LEITE, D. M.; SABATINI JÚNIOR, D. S.; DE FREITAS, A. B. D. A.; MIRANDA, R. T.; SWERTS, M. S. O.; DE BARROS, L. M. Perfil biopsicossocial de portadores de anoftalmia no sul de Minas Gerais - Brasil. *Arq. Bras. Oftalmol*, São Paulo, v. 71, n. 6, p. 855-859, nov./dec. 2008.
- CHALASANI, R.; POOLE-WARREN, L.; CONWAY, R. M.; BEN-NISSAN, B. Porous orbital implants in enucleation: a systematic review. *Surv Ophthalmol*, Sydney, v. 52, n. 2, p. 145-155, mar./apr. 2007.
- CHEN, Y.; CUI, H. High density porous polyethylene material (Medpor) as an unwrapped orbital implant. *Journal of Zhejiang University*, Hangzhou, v. 7, n. 8, p. 679-682, aug. 2006.
- CHUO J. Y.; DOLMAN P. J.; NG T. L.; BUFFAM F. V.; WHITE V. A. Clinical and histopathologic review of 18 explanted porous polyethylene orbital implants. *Ophthalmology*, Vancouver, v. 116, n. 2, p. 349-354, feb. 2009.
- CORDER, G. W.; FOREMAN, D. I. Nonparametric statistics for non-statisticians: a step-by-step approach. New Jersey: Wiley, 2009. 247p.
- GOIATO, M. C.; HADDAD, M. F.; DOS SANTOS, D. M.; PESQUEIRA, A. A.; RIBEIRO, P. P.; MORENO, A. Orbital implants insertion to improve ocular prostheses motility. *The Journal of Craniofacial Surgery*, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 870-875, may. 2010.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical biochemistry of domestic animals. 6. ed. California: Academic Press, 2008. 916p.

- MOURA, E. M., VIEIRA, G. S. S. Uso do implante esférico Medpor <sup>TM</sup> : análise de 61 cirurgias orbitárias. *Arq. Bras. Oftamol.*, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 7-12, jan./fev. 2007.
- PARK, W. C.; HAN, S. K.; KIM, N. J.; CHUNG, T. Y.; KHWARG, S. I. Effect of basic fibroblast growth factor on fibrovascular ingrowth into porous polyethylene anophthalmic socket implants. *Korean J Ophthalmol*, Seoul, v. 19, n. 1, p. 1-8, mar. 2005.
- RANZANI, J.J.; SCHELLINI, S.A.; MARQUES, M.E.; TAGA, E.M. Repair of the anophthalmic cavity of rats with synthetic hydroxipatite. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 10, p. 1181-1186, 1997.
- SADIQ, S. A.; MENGHER, L. S; LOWRY, J.; DOWNES, R. Integrated orbital implants: a comparison of hydroxyapatite and porous polyethylene implants. *Orbit*, Nottingham, v. 27, n. 1, p. 37-40, jan. 2008.
- TEMENOFF, J. S.; MIKOS, A. G. Biomaterials: the intersection of biology and materials science. Nova Jersey: Pearson Prentice Hall, 2008. 478p.