

RODRIGO ALMEIDA VIEIRA SANTOS

**ÉTER DECAFLUORO-DI-N-PENTIL: UMA NOVA OPÇÃO EXPERIMENTAL DE
AGENTE TAMPONANTE INTRA-VÍTREO**

Brasília

2012

RODRIGO ALMEIDA VIEIRA SANTOS

**ÉTER DECAFLUORO-DI-N-PENTIL: UMA NOVA OPÇÃO EXPERIMENTAL DE
AGENTE TAMPONANTE INTRA-VÍTREO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pereira de Ávila

Co-Orientador: Prof. Dr. Stanley Chang

Brasília

2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 1000843.

Santos, Rodrigo Almeida Vieira.
S237d DFPE : uma nova opção experimental de agente tamponante
intra-vítreo / Rodrigo Almeida Vieira Santos. -- 2012.
xi, 50 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Faculdade
de Medicina, Pós-Graduação em Ciências Médicas, 2012.
Inclui bibliografia.
Orientação: Marcos Pereira de Ávila.

1. Retina - Doenças. 2. Vitreorretinopatia proliferativa.
3. Fotorreceptores. 4. Substitutos vítreos (Oftalmologia).
I. Ávila, Marcos. II. Título.

CDU 617.735

RODRIGO ALMEIDA VIEIRA SANTOS

**ÉTER DECAFLUORO-DI-N-PENTIL: UMA NOVA OPÇÃO EXPERIMENTAL DE
AGENTE TAMPONANTE INTRA-VÍTREO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Médicas
da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito
para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marcos Pereira de Ávila (orientador):_____

Prof. Dra. Maria Regina Catai Chalita:_____

Prof. Dr. José Ricardo Costa:_____

Prof. Dr. Wener Passarinho Cella:_____

Prof. Dr. João Carlos Diniz Arraes:_____

Prof. Dr. Alexandre Augusto Cabral de Melo Ventura (suplente):_____

Data: 31/07/2012

DEDICATÓRIA

À minha família,

À minha esposa, Daniela, pelo companheirismo nesta jornada.

À minha filha, Beatriz, por preencher minha vida de paz e felicidade.

Ao meu pai, Antônio Vieira, pela referência fundamental na minha formação pessoal e profissional.

À minha mãe, Maria Almeida, pelo incentivo contínuo à busca de aperfeiçoamento dos meus conhecimentos, pelos ensinamentos essenciais na construção de minha personalidade e pelo suporte incondicional em todos os momentos.

À minha irmã, Karlla, pelo exemplo de honestidade e bondade possíveis em um ser humano.

A todos vocês, minha sincera gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Marcos Ávila, Professor Titular da Disciplina de Oftalmologia e Chefe do Centro de Referência em Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, pelo exemplo profissional a ser seguido e pela orientação desta tese.

Ao Professor Doutor Stanley Chang, Chefe do Departamento de Oftalmologia da Universidade Columbia em Nova Iorque, Estados Unidos da América, pelo exemplo de ser humano que é e por ser o mentor desta pesquisa.

Ao Doutor Pedro Filho, farmacêutico, pela colaboração essencial para ingresso na pós-graduação.

À Professora Doutora Karlla Almeida Vieira, Odontopediatra, pelo suporte fundamental para organização desta tese.

Ao Professor Doutor João Carlos Diniz Arraes, da Universidade Federal do Tocantins, pela ajuda na estruturação deste trabalho.

Ao Professor Doutor Wener Passarinho Cella, do Centro Brasileiro da Visão, pelo suporte durante as análises eletrorretinográficas.

À Professora Doutora Maria Regina Catai Chalita, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pela orientação no manuscrito deste trabalho.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente na realização desta pesquisa.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Vitreorretinopatia proliferativa (VRP) continua a ser a principal causa de redescolamento da retina e da cegueira após descolamento da retina, tendo seu local habitual de proliferação e redescolamento o quadrante inferior. Assim, existe a necessidade de se buscar um substituto vítreo que seja adequado para uso, durante um período limitado, no pós-operatório. Este agente tamponante deve ser mais pesado que a água, mais leve que o perfluorocarbono líquido e compatível com o olho para curto ou longo prazo. **OBJETIVOS:** Avaliar o decafluoro-di-n-pentil (DFPE) como tamponante vítreo examinando a tolerância ocular, através de exame clínico, eletrorretinográfico e histológico em olhos de coelhos albinos. **DESENHO:** experimental e prospectivo. **MÉTODOS:** Treze coelhos machos, albinos, da raça Nova Zelândia foram divididos em quatro grupos e submetidos a vitrectomia mecânica: Grupo 1- DFPE (0,8 a 1,0ml) foi injetado em um olho de quatro coelhos, acompanhados por seis meses; Grupo 2- DFPE (0,8 a 1,5ml) foi injetado em um olho de quatro coelhos, acompanhados por 12 meses; Grupo 3- foi injetado uma mistura de DFPE (1,0ml) e óleo de silicone (OS)(0,2ml) 5000 centistokes em um olho de três coelhos, acompanhados por seis meses; e Grupo 4- solução salina balanceada (SSB) foi injetado em um olho de dois coelhos e acompanhados por 12 meses, servindo como controle operado em conjunto com o olho não operado de cada grupo. Avaliação pós-operatória incluiu inspeção do segmento anterior, tonometria, oftalmoscopia binocular indireta e eletrorretinograma (ERG) escotópico. Após 1 mês de remoção do DFPE e OS, outro ERG foi realizado em cada grupo antes da enucleação e análise histológica. **RESULTADOS:** Clinicamente, nos grupos 1, 2 e 3, o líquido ocupou a porção inferior da cavidade vítrea. As gotas menores foram observadas gradualmente, e o líquido gerou pouca inflamação na cavidade vítrea. A dispersão do líquido apareceu 2 semanas após a cirurgia e para o restante do acompanhamento, o tamanho da gota permaneceu estável. Catarata subcapsular posterior apareceu nos olhos com as quantidades grandes de DFPE (> 50%). Os restos celulares foram observados entre os grupos com DFPE e solução salina balanceada (SSB) em 6 de 8 olhos, permanecendo estável até o fim do estudo. Os achados histológicos nos grupos 1 e 2 não mostraram nenhuma mudança detectável na espessura da camada nuclear externa, mas a saída ocasional de núcleos da camada de fotorreceptores ocorreu na retina inferior. Espessamento da retina interna foi observado também inferiormente. A retina interna ficou bem preservada nos grupos 1, 2 e 3. O ERG dos grupos 1, 2 e 3 não apresentou alteração no tempo de culminação da onda *a* e onda *b*, mas a amplitude da onda *b* mostrou-se elevada ($p < 0,001$) até o 6° mês de seguimento, não apresentando significância estatística ($p > 0,05$) até o final do estudo quando comparado com o grupo controle. **CONCLUSÕES:** Decafluoro-di-n-pentil demonstrou o mínimo de efeitos adversos na retina dos coelhos, porém estudos adicionais são necessários antes de uso clínico como agente tamponante.

PALAVRAS-CHAVE: substituto vítreo, líquido perfluoronado, descolamento de retina, vitreorretinopatia proliferativa, fotorreceptores.

ABSTRACT

BACKGROUND: Proliferative vitreo-retinopathy (PVR) continues to be the primary cause of retinal redetachment. The usual site of proliferation and redetachment is the inferior retina. The hypothesis regarding intraocular liquid perfluorochemical use is that it would be suitable as internal tamponade for a limited period of time. **PURPOSE:** To evaluate decafluoro-di-n-pentyl ether (DFPE), a liquid perfluorochemical, as a temporary vitreous tamponade by examining ocular tolerance through clinical, histological and electroretinographic examination, in rabbits' eyes. **DESIGN:** Prospective, experimental. **METHODS:** Thirteen New Zealand white males rabbits were divided into four groups after mechanical vitrectomy. Group 1 - DFPE (0.8 to 1.0 ml) was injected in one eye of four rabbits, and were followed for six months after surgery; group 2 - DFPE (0.8 to 1.5 ml) was injected in one eye of four rabbits, and were followed for twelve months; group 3 - a mixture of DFPE (1.0 ml) and silicone oil (0.2 ml) 5000 centistokes was injected in one eye of three rabbits, and were followed for six months, and group 4 - balanced salt solution (BSS) was injected in one eye of two rabbits, and were followed for up 12 months that served as an operated control group in conjunction with the unoperated eye of each group. Postoperative clinical evaluation included inspection of the anterior segment, tonometry, indirect binocular ophthalmoscopy and scotopic electroretinogram test (ERG). Following 1 month of DFPE and silicone oil (SiO) removal, another ERG test was performed in each group before the eyes were enucleated and processed for histological evaluation. **RESULTS:** Clinically, on groups 1, 2 and 3, the liquid occupied the inferior portion of the vitreous cavity. Smaller droplets were gradually observed, and the liquid appeared to be well tolerated with little vitreous inflammation. Dispersion of the fluid appeared 2 weeks postoperatively and for the remainder of follow-up, globule size remained stable. Posterior subcapsular cataracts appeared in eyes with large fills of DFPE (> 50%). Cellular debris was observed at the interface between DFPE and physiological fluid in 6 of 8 DFPE-injected eyes and this remained unchanged until the end of study. Histological findings on group 1 and 2 showed no detectable change in outer nuclear layer thickness, but occasional dropout of photoreceptor cell nuclei occurred in inferior retina. Thickening of the inner retina was also noted inferiorly. Foam cells were observed in the vitreous and on the surface of the retina. Except for some vacuolations, the inner retina was well preserved in all DFPE and DFPE + SiO-injected eyes. Penetration of the liquid into the inner retina was not seen. On the ERG of DFPE and DFPE + SiO-injected eyes, there was no effect on the a-wave amplitude and b-wave implicit time, but the b-wave amplitude was elevated with statistical significance ($p < 0.001$) at 1, 3 and 6 months postoperatively. On the other hand, there was no statistical difference ($p > 0.05$) at 12 months of follow up and 1 month after DFPE removal when compared with group 4 and unoperated fellow eyes of each group. **CONCLUSIONS:** Decafluoro-di-n-pentyl ether demonstrated minimum adverse effects in retinal rabbits, and therefore appears to be suitable for intraoperative use and short-term vitreous tamponade. **KEYWORDS:** liquid perfluorochemical, vitreous substitute, retinal detachment, proliferative retinopathy, photoreceptors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1.** Pressão intraocular (PIO) nos grupos com DFPE, MIX (DFPE +OS), SSB e controle27
- FIGURA 2.** Fotografias do fundo de olho dos coelhos com DFPE intra-vítreo. Achados clínicos incluem dispersão de líquido (A), formação de catarata (subcapsular posterior) (B) e acúmulo de debris (C).....28
- FIGURA 3.** Resposta do ERG nos olhos de coelhos com DFPE e SSB (solução salina balanceada) com 6 meses de acompanhamento.....30
- FIGURA 4.** Análise eletrorretinográfica, amplitude onda-*b*, dos olhos dos coelhos com DFPE, DFPE + OS (MIX) e SSB acompanhados por 1, 3, 6 e 12 meses de pós-operatório e 1 mês após remoção do líquido31
- FIGURA 5.** Microfotografia da lâmina para análise histológica da retina neurosensorial após 6 meses de seguimento com DFPE intra-vítreo. (A) Retina superior, (B) retina inferior (magnificação - 40x; coloração hematoxilina-eosina)33
- FIGURA 6.** Microfotografia da lâmina para análise histológica da retina neurosensorial após 12 meses de DFPE intra-vítreo seguido de 1 mês depois da remoção do líquido. (A) Retina superior, (B) retina inferior. (magnificação - 63x; coloração hematoxilina-eosina)34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de peso e sexo dos coelhos	13
Tabela 2. Relação das propriedades físico-químicas dos líquidos estudados	16
Tabela 3. Distribuição dos olhos dos coelhos submetidos à vitrectomia e injeção de líquido intra-vítreo nos grupos de estudo	17
Tabela 4. Distribuição do número de olhos de coelhos estudados e tempo para enucleação após cirurgia	20
Tabela 5. Distribuição dos olhos dos coelhos não operados com respectivo peso.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μm = Micrômetros

% = Por cento

ANOVA = Análise de Variância

ARVO = do inglês, "*Association for Research in Vision and Ophthalmology*"

AT = Agente Tamponante

CCG = Camada de Células Ganglionares

CFN = Camada de Fibras Nervosas

CNE = Camada Nuclear Externa

CNI = Camada Nuclear Interna

CPE = Camada Plexiforme Externa

CPI = Camada Plexiforme Interna

DFPE = Éter decafluoro-di-n-pentil

DP = Desvio-padrão

DPV = Descolamento Posterior do Vítreo

DR = Descolamento da Retina

EPR = Epitélio Pigmentado da Retina

ERG = Eletrorretinograma

et al = e outros

FR = Fotorreceptores

g = gramas

IACUC = do inglês, "*Institutional Animal Care and Use Committee*"

IV = Intra-vítreo

IVI = do inglês, "*Intravitreal Injection*"

LSR = Líquido Sub-retiniano

mg = miligramas

ml = mililitros

MLE = Membrana Limitante Externa

MLI = Membrana Limitante Interna

mm = milímetros

OBI = Oftalmoscopia Binocular Indireta

OS = Óleo de Silicone

°C = Graus Celsius

ppm = partes por milhão

PVR = do inglês, “Proliferative Vitreoretinopathy”

RNS = Retina Neurosensorial

SiO = do inglês, “Silicone Oil”

SSB = Solução Salina Balanceada

UnB = Universidade de Brasília

VRP = Vitreorretinopatia Proliferativa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A retina	1
1.2 O vítreo	2
1.3 O descolamento de retina	3
1.4 O tratamento do descolamento de retina	5
1.5 O substituto vítreo	6
1.5.1 Gás	7
1.5.2 Óleo de silicone	8
1.5.3 Perfluorcarbono líquido	9
2. OBJETIVOS	11
3. MÉTODOS	12
3.1 Desenho do estudo	12
3.2 Considerações éticas	12
3.3 Os animais	12
3.4 O composto	15
3.5 Grupos de estudo	16
3.6 Procedimentos	18
3.7 A análise histológica da retina	23
3.8 Expressão dos resultados e análise estatística	24
4. RESULTADOS	25

4.1 Os efeitos do procedimento de vitrectomia e injeção do composto em olhos de coelhos albinos	26
4.2 Os efeitos do composto em olhos de coelhos albinos: análise eletrorretinográfica	29
4.3 Os efeitos do composto em olhos de coelhos albinos: análise histológica	32
5. DISCUSSÃO	35
5.1 Injeção intra-vítreo em olhos de coelhos albinos	35
5.2 Os efeitos do composto em olhos de coelhos albinos	36
5.3 Perspectivas futuras	40
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
ANEXOS	49
ANEXO 1 - Formulário de acompanhamento pós-operatório	49
ANEXO 2 - Documentação de isenção de conflitos de interesse	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 A RETINA:

A retina é o estrato neurosensorial do olho, sendo responsável pela transdução do estímulo visual (luminoso) em elétrico (neuronal). Representa a túnica íntima, localizando-se internamente à coróide e externamente ao corpo vítreo. Macroscopicamente, divide-se em retina periférica e retina central ou pólo posterior. Microscopicamente, possui suas células distribuídas em dez camadas. ⁽¹⁾

Da região mais externa (próxima a coróide) para a mais interna (próxima ao corpo vítreo), são elas:

1. Epitélio Pigmentado da Retina (EPR) – Camada monocelular formada por células pigmentadas que apresentam íntimo contato com o segmento externo dos fotorreceptores.

2. Camada de Fotorreceptores – Região onde se localizam os segmentos externos dos fotorreceptores (FR), responsável pela captação dos estímulos luminosos e sua transdução elétrica. Os FR são considerados o primeiro neurônio das vias ópticas e dividem-se em dois tipos: cones e bastonetes.

3. Membrana Limitante Externa (MLE): Delgada membrana formada pela extremidade externa das células de Müller.

4. Camada Nuclear Externa (CNE): Formada pelos núcleos dos FR. Organiza-se em cinco a oito estratos celulares que compõe sua estrutura.

5. Camada Plexiforme Externa (CPE): Região de sinapses entre os FR, células amácrinas, horizontais e bipolares.

6. Camada Nuclear Interna (CNI): Formada pelos núcleos das células horizontais, amácrinas, bipolares e de Müller.

7. Camada Plexiforme Interna (CPI): Camada de sinapses entre as células da CNI

e as células ganglionares da retina.

8. Camada de Células Ganglionares (CCG): Formada pelos núcleos das células ganglionares da retina, considerada o segundo neurônio das vias ópticas.

9. Camada de Fibras Nervosas (CFN): Composta pelo prolongamento central dos axônios das células ganglionares que convergem centripetamente para formar o nervo óptico.

10. Membrana Limitante Interna (MLI): Formada pela porção mais interna das células de Müller.

1.2 O VÍTREO:

O corpo vítreo, frequentemente denominado de humor vítreo ou simplesmente vítreo, é um gel claro e transparente que preenche a cavidade posterior do olho e ocupa mais de dois terços do volume ocular. ^(1, 2) Tem densidade de $1,0053\text{g cm}^{-3}$ a $1,0089\text{g cm}^{-3}$, índice de refração de 1,3345 a 1,3348 e pH variando de 7,0 a 7,4. Tem 99% de água em sua composição e 1% de fibras colágeno do tipo II, V, VI, IX e XI, glicosaminoglicanos (principalmente ácido hialurônico) e outras proteínas não colagenosas estruturais. As fibras de colágeno oferecem uma estrutura de suporte rígido enquanto as macromoléculas de ácido hialurônico conferem propriedades de absorção de choque. ^(3, 4) Os detalhes sobre as propriedades mecânicas e viscoelásticas do vítreo humano foram descritos em pela primeira vez em 1980. ⁽⁵⁾ Do ponto de vista funcional, o vítreo protege estruturas e tecidos de trauma mecânico, permite a circulação de solutos, metabólitos e nutrientes por todo o olho, regula a tensão de oxigênio dentro do olho, contribui para manter a forma do globo ocular e mantém o cristalino e a retina no lugar. ⁽⁶⁾

O processo de envelhecimento natural do vítreo ocorre com liquefação, sinérese e encolhimento do gel produzindo um processo denominado de descolamento posterior do vítreo (DPV). ^(7, 8) No DPV o córtex do vítreo se separa da retina. As fibras de colágeno no vítreo são mantidas separadas por cargas elétricas, que naturalmente apresentam diminuição das forças repulsivas com o

tempo, formando lacunas no gel vítreo. Estudos mostram que pessoas por volta dos 88 anos de idade apresentam vítreo totalmente liquefeito^(9, 10), mas o DPV pode ocorrer em pessoas mais jovens, como nos míopes e pacientes que realizaram cirurgia de catarata.⁽¹¹⁾

Existe estreita relação entre o DPV e áreas da retina em anexo, onde a tração existente entre o vítreo e retina pode provocar rasgos em regiões mais frágeis, muitas vezes formando roturas em ferradura que, se não forem reparadas, podem fazer com que o vítreo liquefeito migre para o espaço sub-retiniano provocando o descolamento de retina.⁽¹²⁻¹⁴⁾

1.3 O DESCOLAMENTO DE RETINA:

Há mais de três séculos foi descrito pela primeira vez um descolamento de retina (DR) em animais e a primeira publicação de descolamento de retina em humanos ocorreu 98 anos depois.⁽¹⁵⁾

O termo descolamento de retina é usado para descrever a separação da retina neurossensorial (RNS) do epitélio pigmentar da retina (EPR) por quebra das forças que aderem a RNS ao EPR. Como resultado, líquido sub-retiniano (LSR) é retido no espaço entre RNS e EPR.⁽¹⁶⁾ Os principais tipos de DR são:

1. Regmatogênico: (*rhegma* – rotura) ocorre por defeito de toda a espessura da retina sensorial, permitindo que o líquido derivado do gel vítreo liquefeito ocupe o espaço sub-retiniano.

2. Tracional: quando a RNS é puxada do EPR por contração de membranas vitreoretinianas na ausência de uma rotura retiniana.

3. Exsudativo: (seroso, secundário), o líquido sub-retiniano (LSR) é derivado do fluido dos vasos da RNS ou da coróide, ou de ambos. Não é causado nem por rotura nem por tração.

Com a perda de contato entre as células do EPR e a RNS, tem-se em um primeiro momento, um processo de proliferação celular, formando um grupamento de células unidiferenciadas e membranas tanto no vítreo quanto em ambas as superfícies da retina. Em um segundo momento, ocorrerá contração

destas membranas celulares, gerando um componente tracional que pode dificultar a reaplicação da retina descolada ou ocasionar o redescolamento de uma retina inicialmente reaplicada com êxito. ⁽¹⁷⁾

O processo acima, hoje, é denominado de vitreorretinopatia proliferativa (VRP) e foi descrito como uma organização pré-retiniana invadindo a superfície retiniana. ⁽¹⁸⁾ A medida que os cirurgiões foram ganhando experiência com a técnica de introflexão escleral, percebeu-se que alguns DRs regmatogênicos, principalmente os que apresentavam dobras fixas e/ou configuração em funil, não podiam ser reparados através desta abordagem. A primeira evidência que células ectópicas exerciam papel fundamental na VRP foi feita através de um estudo em macacos que demonstrou a presença de células na cavidade vítrea e em ambas as superfícies da retina, denominadas de proliferação perirretiniana maciça (PPM). ⁽¹⁹⁾

Uma vez que esta alteração recebia várias denominações, em 1983, um comitê internacional, patrocinado pela *Retina Society* dos Estados Unidos da América, padronizou o termo para vitreorretinopatia proliferativa e propuseram uma classificação de acordo com sua gravidade. ⁽²⁰⁻²³⁾

Sua incidência é variável de acordo com a população estudada. A maioria dos autores estimam que a VRP esteja presente em torno de 7 a 12% dos descolamentos de retina regmatogênicos chegando a 29% nos casos mais complexos. ⁽²⁴⁻²⁶⁾ Quanto ao tempo entre o início do descolamento e formação da VRP foi observado uma média de dois meses. ⁽²⁷⁾

Com relação à localização, a VRP pode criar pregas estelares isoladas, pregas fixas, alterações sub-retinianas ou membranas epimaculares. ^(28, 29) A ação da gravidade e o posicionamento do paciente no pós-operatório afetam a distribuição das células do EPR, de modo que este processo costuma ser mais intenso nos quadrantes inferiores e no pólo posterior. ⁽³⁰⁾

Apesar dos avanços cirúrgicos, a VRP continua sendo a principal causa de insucesso no reparo do descolamento de retina regmatogênicos causando perda visual severa e muitas vezes atrofia do globo ocular. ⁽³¹⁻³³⁾

1.4 O TRATAMENTO DO DESCOLAMENTO DE RETINA:

O primeiro relato de tratamento do descolamento de retina foi com poções e purgantes em 1722. Em 1853, a descoberta do oftalmoscópio trouxe grandes avanços e, dois anos depois, já se descrevia o primeiro buraco retiniano. (15)

Vários tratamentos foram propostos para o DR, todavia com baixíssima taxa de sucesso (34, 35) até o relato de Jules Gonin onde era sugerido o bloqueio do buraco retiniano, através da *Ignipuncture*, cirurgia equivalente a um termocautério, obtendo, já naquela época, cerca de 50% de sucesso nos casos operados. (36, 37) A partir deste fato, a cirurgia para o tratamento do DR pode ser dividida em duas eras: a) pré-Gonin, antes de 1920; e b) pós-Gonin, depois de 1930.

As técnicas cirúrgicas modernas para reparo do DR evoluíram a partir dos métodos desenvolvidos pelos pioneiros em bloquear roturas retinianas. Custodis, em 1949, introduziu a cirurgia com introflexão escleral que continua em uso no dias atuais. (15) Com a possibilidade de observação binocular através do oftalmoscópio indireto e o auxílio da depressão escleral(38) , o exame detalhado da retina, do vítreo e a localização das roturas através da observação da periferia retiniana, possibilitou o tratamento com retinopexia e tamponamento externo adequado de cada lesão. Na década de 1960 foi introduzido o uso de esponjas de silicone e a crioterapia foi popularizada. (39)

O tamponamento interno foi outra técnica introduzida para ajudar a união da retina e coróide. Descrito pela primeira vez em 1911 por Ohm, a injeção de ar na cavidade vítrea foi utilizada para fechamento de roturas retinianas sem grande repercussão (40) ganhando outro rumo com a utilização de gases expansivos intra-operatórios. (41-43) O óleo de silicone foi utilizado na cavidade vítrea de humanos inicialmente para realizar dissecação de membranas epirretinianas e promover a reaplicação da retina sem grandes resultados no primeiro momento (44-48) , porém com avanços na técnica cirúrgica foi novamente introduzido. (49-53)

Von Graefe e Deutschmann foram os primeiros a defender o corte do vítreo e/ou retina para tratamento do DR. (15) Kasner e colaboradores realizaram

a primeira vitrectomia a céu aberto em 1969 ⁽⁵⁴⁾, mas foi na década de 1970 que a vitrectomia avançou com introdução de novas tecnologias com resultados animadores. ⁽⁵⁵⁻⁵⁸⁾

A etapa mais recente na história do tratamento do descolamento de retina teve seu início na década de 1980 com a utilização de líquido que originalmente fora avaliado como substituto sanguíneo ⁽⁵⁹⁾, mas foi popularizado por Chang e colaboradores na condução dos casos de DR por rotura gigante, mobilizando a retina no pólo posterior, e nos casos de VRP grave modificando a cirurgia de vitrectomia. ⁽⁶⁰⁻⁶³⁾

A evolução do tratamento do descolamento de retina, considerada como um dos grandes sucessos da história da oftalmologia, mostra que nos primeiros 70 anos após descrição do buraco retiniano não se conseguiu nenhuma forma de tratamento e nos anos subsequentes chega-se a uma taxa de sucesso terapêutico de cerca de 98%. ⁽⁶⁴⁾

1.5 O SUBSTITUTO VÍTREO:

Em 1906 foi descrita a primeira utilização de vítreo animal, coelho e bezerro, como substituto vítreo em olhos humanos. No entanto, foi observado intensa reação inflamatória nos olhos estudados por resposta imunológica. ⁽⁶⁵⁾ Mais tarde foi descrito utilização de vítreo humano, também sem sucesso, além de complicações pós-operatórias como catarata, descompensação corneana e glaucoma. ⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾

Injeções de fluidos na cavidade vítrea são executadas como técnicas auxiliares em cirurgia vitreoretinianas. Essas substâncias, conhecidas como substitutos vítreos ou agentes tamponantes (AT), podem ser usadas no intra-operatório ^(69, 70), para reparar rasgos na retina ou descolamentos, e no pós-operatório para ajudar a manter ou apoiar a reinserção cirúrgica da retina. Exercendo uma força que mantém a RNS em aposição ao EPR, os AT são importantes no processo de resolução do DR. Exemplos de AT pós-operatório incluem os gases intravítreos, óleos de silicone e perfluorcarbonos líquidos. ^(63, 69-72)

1.5.1 O GÁS:

Originalmente descrito por Ohm em 1911, impulsionado pela publicação de 1938 ⁽⁷³⁾, o ar passou a ser utilizado com maior frequência mostrando reaplicação da retina em até 75% dos casos estudados. ⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾ Diversos gases não expansíveis já foram utilizados, dentre eles ar ambiente, Nitrogênio, Hélio, Oxigênio, Argônio, Criptônio e Dióxido de Carbono. Novos gases expansíveis começaram a ser utilizados, dentre eles o Hexafluoreto de Enxofre (SF₆) que expande aproximadamente o dobro do seu volume injetado e persiste o dobro do tempo do ar com menisco semelhante ao do ar ambiente. ⁽⁷⁰⁾ Gases com Perfluorcarbono também surgiram como Octafluorociclobutano (C₄F₈), Perfluoroetano (C₂F₆), Perfluoropropano (C₃F₈), Perfluorobutano (C₄F₁₀) e Perfluoropentano (C₅F₁₂) caracterizados por expandirem mais e permanecerem mais tempo que o SF₆. ^(41, 43)

A técnica de retinopexia pneumática (RP) surgiu em 1986 com relatos simultâneos nos Estados Unidos e Espanha. ^(8, 77, 78) A seleção adequada do caso era fundamental para o sucesso da RP. O ideal era descolamento de retina recente, localizado nos quadrantes superiores da retina e fático. O gás então atuava, através das propriedades de tensão superficial, bloqueando a movimentação do líquido para o espaço sub-retiniano, permitindo que o EPR bombeasse ativamente o líquido subretiniano para coróide. Uma vez feito o reposicionamento da RNS com EPR esperava-se a atuação da criopexia ou laserterapia, 5 a 7 dias, para fechamento das roturas. Os gases mais comumente utilizados eram o SF₆ e C₃F₈. A crioterapia, embora frequentemente utilizada no passado e de fácil aplicação, mostrou aumentar a probabilidade de VRP por comprometer a barreira hematorretiniana. ⁽⁷⁹⁾

Os gases de uso intraocular como Perfluorometano, Perfluoroetano, Perfluoropropano e o Hexafluoreto de Enxofre requerem frequentemente que o paciente adote uma posição de cabeça por um período, a fim de manter a pressão do gás contra a retina reaplicada. ^(72, 80) Esta posição pode ser de difícil manutenção para determinados pacientes, como crianças ou idosos; sendo, também, um problema para os pacientes que precisam viajar de avião, uma vez

que mudanças na pressão atmosférica podem causar alargamento da bolha de gás aumentando a pressão intraocular em intensidades prejudiciais. Do mesmo modo, a anestesia geral inalatória não pode ser usada para pacientes que necessitam de tratamento dentário ou outras intervenções cirúrgicas devido a alta solubilidade do gás de inalação (por exemplo, Óxido Nitroso) o qual difunde-se rapidamente dentro da bolha de gás intraocular causando a ampliação da bolha e aumento da pressão intraocular. ^(70,80)

1.5.2 O ÓLEO DE SILICONE :

Embora tenha sido relatado inicialmente em 1962 para tratamento do DR⁽⁴⁴⁾, o Óleo de Silicone (OS) produzia complicações após sua utilização como descompensação corneana e hipertensão ocular entre outros, que o tornaram desfavorável na época. No final da década de 1970 voltou a ser utilizado nas cirurgias de vitrectomia com resultados animadores ⁽⁸¹⁾, tornando-se aliado dos cirurgiões nos tratamentos de DR por trauma e DR com VPR ^(52,82) e em 1994 foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso intraocular como substituto vítreo.

Um estudo multicêntrico, randomizado, controlado e prospectivo, denominado *The Silicone Study Group*, comparou OS e gases de longa duração para tratamento de olhos com VRP grave e mostrou que o uso de OS apresentou resultado superior ao SF₆ e equivalentes ao C₃F₈. ⁽⁸³⁾

Por apresentar tensão superficial em interface com a água (30mN) menor que a interface gás (perfluoropropano-n) com água (70mN) a taxa de sucesso para o fechamento do buraco macular é mais baixa do que com gás (65% - OS vs 91% - gás). ⁽⁸⁴⁾ Além disso, o óleo de silicone deve ser removido depois, devido aos seus efeitos colaterais oculares irreversíveis, tais como glaucoma e descompensação da córnea. ⁽⁸⁵⁾ Nos Estados Unidos está disponível em duas viscosidades, 1000 e 5000 centistokes embora exista relato de que não há diferença no resultado a longo prazo. ⁽⁸⁶⁾

Os Óleos de silicone têm problemas de fluabilidade, pois são mais leve que a água (densidade de $0,97 \text{ g cm}^{-3}$). Sendo assim, um menisco de silicone em contato com a retina, com uma força de empuxo dirigida para cima, resulta em pouco tamponamento efetivo para a retina inferior em um paciente sentado na posição vertical. ⁽⁷⁰⁾

Misturas de óleo de silicone e alcanos perfluorados, com densidade maior que 1 g cm^{-3} , também foram estudados por vários pesquisadores, mas não são de uso comum, principalmente por serem mais pesados e deixarem um espaço livre na parte superior da cavidade vítrea, podendo levar à concentração de vários compostos envolvidos na VRP, bem como, pela dificuldade de isolar esses líquidos de alta pureza devido à sua composição de polímeros de cadeia curta, com conseqüente surgimento de DR superior. ⁽⁸⁷⁻⁹⁴⁾

1.5.3 PERFLUROQUÍMICOS LÍQUIDOS:

Os perfluorocarbonos são compostos desenvolvidos para utilização em engenharia mecânica e indústrias. Em medicina, o perfluorcarbono líquido (PFCL) foi utilizado como substituto sanguíneo pela capacidade de transportar oxigênio e ser biologicamente inerte. Em Oftalmologia, foram utilizados pela primeira vez como substituto vítreo em 1982. ⁽⁵⁹⁾ Posteriormente, foi popularizado na manipulação de alguns descolamentos de retina com rotura gigante. ⁽⁶¹⁾

O PFCL é mais pesado que a água, densidade superior a $1,6 \text{ g cm}^{-3}$, tornando-se um potencial agente de tamponamento sem apresentar problemas de fluabilidade e de posicionamento. Embora seja o composto de eleição na manipulação, mobilização e reaplicação da retina, o PFCL, por ser pesado, quando na cavidade vítrea de animais por mais de uma semana pode apresentar diminuição da camada plexiforme externa da retina inferior ou outros efeitos funcionais negativos significativos. ^(89, 95, 96) Assim, permanece a necessidade de um substituo vítreo que seja adequado para o uso durante um período limitado no pós-operatório. Este agente de tamponamento deve ser mais pesado que a água, mais leve que o PFCL e compatível com o olho para curto ou longo prazo.

Em relação à retina neurossensorial, a descrição de lesões tóxicas induzidas por agentes tamponantes neste tecido ocular ^(63, 89, 95-97) faz com que seja essencial uma avaliação da integridade desta camada em qualquer estudo que se proponha determinar a toxicidade retiniana induzida por um agente tamponante.

Tais lesões tóxicas podem não ser percebidas clínica e histologicamente em um curto período de acompanhamento, no entanto, podem, em longo prazo, surgir como áreas de atrofia e perda celular nas camadas retinianas como ocorrem com alguns fármacos. ^(98, 99)

Diante disto, foi realizado neste trabalho um detalhado estudo morfológico da histologia retiniana, bem como, um estudo eletrorretinográfico para se avaliar possíveis sinais de toxicidade da retina.

2 OBJETIVOS

1. Avaliar o DFPE como substituto vítreo através do exame de tolerância ocular e suas possíveis complicações utilizando exame clínico, histológico e eletrorretinográfico em coelhos albinos.
2. Avaliar histologicamente a toxicidade sobre a retina neurosensorial de DFPE em olhos de coelhos albinos após 12 meses de permanência intra-vítreo
3. Avaliar eletrorretinograficamente a toxicidade retiniana em coelhos albinos que permaneceram 1, 3, 6 e 12 meses com 0,8 a 1,5 ml de DFPE intra-vítreo e mistura DFPE com óleo de silicone 5000 centistokes.

3 MÉTODOS

3.1. DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo prospectivo, experimental, placebo-controlado com vinte e seis olhos de treze coelhos albinos, nos quais foram realizados injeções intra-vítreas de éter decafluoro-di-n-pentil, óleo de silicone ou solução salina balanceada, após vitrectomia sem sutura.

O estudo foi conduzido no Departamento de Oftalmologia da Universidade Columbia, Nova Iorque – Estados Unidos da América, entre janeiro de 2007 e janeiro de 2009.

3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi realizado após avaliação e aprovação pelo Comitê Institucional para uso e proteção dos animais dos Estados Unidos (IACUC) e todos os animais foram tratados de acordo com o estatuto para uso de animais em pesquisas da visão e oftalmologia da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* – ARVO (ARVO, 2006).

3.3 OS ANIMAIS

3.3.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos treze coelhos albinos do sexo masculino, raça Nova Zelândia, com peso entre 2000 e 3000 gramas (valor médio do peso = 2512,3g) adquiridos pela Universidade Columbia. **(Tabela 1)**

Tabela 1. Distribuição de peso e sexo dos coelhos

COELHO	PESO (gramas)	SEXO
01	2080	Masculino
02	2460	Masculino
03	2670	Masculino
04	2650	Masculino
05	2800	Masculino
06	2410	Masculino
07	2130	Masculino
08	2320	Masculino
09	2940	Masculino
10	2660	Masculino
11	2380	Masculino
12	2810	Masculino
13	2350	Masculino

Legenda:

01 ao 13 – Coelhos submetidos à vitrectomia, injeção de líquido e sacrificados/enucleados após 6 e 12 meses de acompanhamento.

3.3.2. AVALIAÇÃO INICIAL

Foi realizada avaliação da retina de todos os coelhos por meio de oftalmoscopia binocular indireta (OBI) com lente de 28 dioptrias e inspeção do segmento anterior com lâmpada de fenda portátil para avaliação da presença de catarata, pressão intraocular utilizando tonômetro de aplanção portátil (Tonopen VET, Reichert, Estados Unidos da América) ou outra alteração de transparência dos meios que pudessem inviabilizar o adequado acompanhamento do fundo de olho pela OBI.

3.3.3. ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS

Uma equipe de médicos-veterinários ficou responsável pela avaliação diária dos animais. Os tratamentos gerais de limpeza e alimentação foram

executados por equipe de funcionários do departamento de pesquisa em animais da Universidade Columbia – Nova Iorque. Cada animal recebeu uma tatuagem na orelha com seu número de identificação, após realização de sorteio dos animais para garantir aleatoriedade.

3.3.4 ALOJAMENTO E GAIOLAS

Os coelhos ficaram no quinto andar do Edifício Edward Harkness em Nova Iorque, Estados Unidos da América, onde existia alojamento apropriado com 80 metros quadrados coberto, bem ventilado e protegido por telas. Gaiolas individuais metálicas foram utilizadas para acomodar cada animal.

3.3.5 ALIMENTAÇÃO

Cada gaiola possuía bebedouro individual com água para consumo diário do animal. Cada coelho foi alimentado com ração balanceada peletizada para coelhos de acordo com planejamento feito pelos médicos veterinários.

3.3.6 HIGIENE

Duas vezes por dia, a bandeja sob a gaiola era removida e lavada para retirar fezes e urina acumulada. A cada cinco dias, o chão do alojamento era limpo com solução desinfetante e água corrente. Ainda uma vez por semana, os animais eram retirados da gaiola, um a um, sendo colocados em gaiolas sobressalentes, individualmente. Naquele momento, cada gaiola era flambada para garantir a assepsia ideal para a sobrevivência do animal.

3.3.7 QUARENTENA

Todos os animais adquiridos passaram por um período de 40 dias de isolamento, no qual o animal permaneceu no alojamento antes da realização dos procedimentos. Tal procedimento serviu para avaliação da boa adaptação do

animal e para evitar que qualquer intercorrência pela adaptação inicial do coelho ao meio fosse falsamente atribuída a qualquer um dos procedimentos propostos.

3.3.8 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do trabalho coelhos que apresentaram durante o período de quarentena qualquer sinal de alteração retiniana, opacidade de meios oculares, doença infecciosa ocular ou sistêmica ou, ainda, qualquer outra que pudesse comprometer seu adequado acompanhamento ou a possibilidade do animal atingir o final do estudo.

3.4 O COMPOSTO

O composto éter decafluoro-di-n-pentil® foi sintetizado no Japão pela Companhia Asahi Glass, utilizando pentafluoro-pentanol como material inicial. Através da cromatografia a gás, o material mostrou-se ser 99,97% de DFPE após purificação. O composto foi designado como molécula linear com dez carbonos sendo não polar com perfluorados em suas terminações para alcançar inércia química e biológica, bem como mais hidrogênio que flúor para alcançar densidade reduzida. A ligação com éter foi fator necessário para síntese, além de conferir um ponto de congelamento bem reduzido. Análise de cinco amostras extraídas após um mês de permanência na cavidade vítrea de coelhos revelou pureza de 99,94%.

O DFPE é completamente miscível em perfluor-n-octano (PFnO) e solúvel em silicone líquido em 20%. Suas propriedades são claridade óptica, inércia, hidrofobicidade e baixa pressão de vapor.

O óleo de silicone de 5000 centistokes foi obtido pela empresa Adatomed (Munich, Alemanha). Detalhes das propriedades físico-químicas dos líquidos utilizados estão listados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Relação das propriedades físico-químicas dos líquidos estudados

	DFPE	OS
Fórmula	$C_2F_5C_3H_6-O-C_3H_6C_2F_5$	C_2H_6OSi
Peso Molecular, kd	489	423
Densidade, g cm ⁻³	1,345	0,97
Índice de refração	1,34	1,40
Viscosidade, centistokes a 25°C	2,7	5000
Tensão superficial, dinas/cm a 25°C	17,6	20
Ponto de ebulição, °C	200	>300

Legenda:

DFPE = Éter decafluoro-di-n-pentil

OS = Óleo de silicone

kd = kilodáton; gcm⁻³ = grama por centímetro cúbico; °C = grau Celsius

3.5 GRUPO DE ESTUDO

Os coelhos foram distribuídos de forma aleatória por sorteio em quatro grupos. No primeiro grupo, denominado Grupo 1, foi injetado de 0,8 a 1ml de DFPE em um olho de quatro coelhos e acompanhados durante seis meses após procedimento cirúrgico. No segundo grupo, denominado Grupo 2, foi injetado de 0,8 a 1,5ml de DFPE em um olho de quatro coelhos e acompanhados durante doze meses após procedimento cirúrgico. No terceiro grupo, denominado Grupo 3, foi injetado uma mistura de DFPE (1,0ml) e óleo de silicone (0,2ml) 5000 centistokes em um olho de três coelhos e acompanhados durante seis meses após procedimento cirúrgico; e, no quarto grupo, denominado Grupo 4, solução salina balanceada foi mantida dentro da cavidade vítrea de um olho de dois coelhos que foram acompanhados por 12 meses após procedimento cirúrgico.

O controle do olho operado foi formado pelo Grupo 4 juntamente com o olho contralateral não operado de cada grupo. **(Tabela 3)**

Tabela 3. Distribuição dos olhos dos coelhos submetidos à vitrectomia e injeção de líquido intra-vítreo nos grupos de estudo

COELHO	OLHO	GRUPO
01	D	1
01	E	OCLNO
02	D	OCLNO
02	E	1
03	D	1
03	E	OCLNO
04	D	1
04	E	OCLNO
05	D	2
05	E	OCLNO
06	D	2
06	E	OCLNO
07	D	2
07	E	OCLNO
08	D	OCLNO
08	E	2
09	D	3
09	E	OCLNO
10	D	3
10	E	OCLNO
11	D	OCLNO
11	E	3
12	D	4
12	E	OCLNO
13	D	OCLNO
13	E	4

Legenda:

D = Direito 1 = Grupo 1 (DFPE - 6 meses)

3 = Grupo 3 (DFPE+OS - 6 meses)

E = Esquerdo 2 = Grupo 2 (DFPE -1 ano)

4 = Grupo 4 (SSB - 1 ano)

OCLNO = olho contralateral não operado

3.6 PROCEDIMENTOS

3.6.1 A oftalmoscopia binocular indireta

Foi realizada antes e após a injeção intraocular, assim como antes e após a enucleação, a oftalmoscopia binocular indireta (OBI) para se averiguar a integridade retiniana e a transparência de meios adequada. A OBI serviu para evitar que qualquer alteração anterior à injeção ou posterior à enucleação fosse falsamente atribuída ao procedimento.

3.6.2 A vitrectomia mecânica e injeção intraocular de DFPE

Os coelhos foram anestesiados com uma injeção intramuscular combinada de cloridrato de xylazina (5mg/kg) e cloridrato de ketamina (35mg/kg) e, quando necessário, a dose das drogas foi progressivamente aumentada até que fosse atingido o plano anestésico adequado. Foi considerada profundidade cirúrgico-anestésica ideal quando, após provocação de estímulo doloroso na pata do animal, não foi percebido nenhum tipo de contração muscular ou lacrimejamento, garantindo, assim, total analgesia trans-operatória.
(100)

Para dilatação pupilar, foi utilizada uma mistura de colírios de tropicamida a 1% e fenilefrina a 10% (1:1) e colírio de proximetacaína 0,5% para anestesia tópica. De acordo com os padrões de conduta para injeção intra-vítrea,⁽¹⁰¹⁾ após anti-sepsia local com colírio de iodo-povidona 5%, aposição de campo cirúrgico estéril com adequada proteção ciliar e colocação do blefarostato, foram realizadas duas esclerotomias auto-selantes, nos quadrantes temporal superior e inferior, de calibre 25 a 3mm do limbo para vitrectomia via *pars plana* utilizando o aparelho Alcon Accurus Ophthalmic Surgical System (Alcon Laboratories, Ft. Worth, Texas, Estados Unidos), a iluminação coaxial foi fornecida através do microscópio cirúrgico Leica M501 (Heerbrugg, Switzerland). O vítreo cortical foi removido o mais completo possível seguido da injeção única intra-vítrea de DFPE que foi realizada via *pars plana* com agulha de

calibre 30 gauge utilizando o mesmo trocater/cânula localizado a 3mm do limbo superior, definidos por sorteio e mascarada, de 0,8ml a 1,5ml de DFPE nos Grupos 1 e 2, ou de 1,0ml de DFPE + 0,2ml de óleo de silicone no Grupo 3. Uma vez que as incisões eram auto-selantes, pomada de antibiótico foi aplicada no final de cada procedimento cirúrgico.

Após vitrectomia e injeção, os coelhos retornaram para suas gaiolas e ficaram em observação pelo veterinário para, caso surgisse algum sinal de dor ou desconforto, eles fossem devidamente medicados (buprenorfina 0,05mg/kg subcutânea).

3.6.3 A avaliação oftalmológica pós-operatória

Todos os coelhos foram avaliados nos 1º, 7º, 30º, 90º, 180º dias pós-operatórios e os Grupos 2 e 4, também, com 1 ano de pós-operatório, por meio de inspeção, tonometria e oftalmoscopia binocular indireta, com lente de 28 dioptrias, para avaliação do possível surgimento de complicações pós-operatórias relacionadas ao procedimento de injeção intra-vítreo (catarata, endoftalmite, descolamento de retina e outras opacidades de meios).

3.6.4 A remoção intraocular de DFPE

Ao final de seis meses de acompanhamento dos grupos 1 e 3, bem como 12 meses no grupo 2, os coelhos foram submetidos a nova vitrectomia para remoção do DFPE e óleo de silicone, utilizando o mesmo protocolo de injeção. A remoção foi realizada de forma passiva através de troca do DFPE por SSB. **(Tabela 4)**

Tabela 4. Distribuição do número de olhos de coelhos estudados e tempo para enucleação após cirurgia

Procedimento experimental	Número de olhos	Tempo para sacrifício	
		12 meses	1 mês após remoção do DFPE
Grupo 1- DFPE*			
(6 meses de seguimento)	4		4
Group 2-DFPE*	4		4
(12 meses de seguimento)			
Group 3 - MIX*	3		3
(6 meses de seguimento)			
Group 4 - SSB*	2	2	
(12 meses de seguimento)			
Controle não operado	13	2	11
Total	26	4	22

- *MIX = DFPE + OS; DFPE = éter decafluoro-di-n-pentil, OS = óleo de silicone (5000 centistokes), SSB = solução salina balanceada

3.6.5 A análise eletrorretinográfica da retina

Eletrorretinograma escotópico foi realizado nos coelhos de todos os grupos antes da intervenção experimental (pré-operatório). Nos grupos 1 e 3, o eletrorretinograma escotópico foi repetido com 1, 3 e 6 meses pós-intervenção. Nos grupos 2 e 4, o exame foi repetido com 1, 3, 6 e 12 meses após intervenção. Em todos os grupos foi realizado eletrorretinograma 1 mês após remoção do DFPE e do óleo de silicone.

Para realização do exame, os coelhos foram colocados em sala escura para adaptação ao escuro por duas horas seguida de imobilização em suporte de acrílico. Para dilatação pupilar, foi utilizada uma mistura de colírios de tropicamida a 1% e fenilefrina a 10% (1:1) e colírio de proximetaína 0,5% para anestesia tópica. Foram utilizados eletrodos subdérmicos de platina (Burian-Allen E.R.G. Electrode, Hansen Ophthalmic Development Lab, Coralville, Iowa – Estados Unidos da América), sendo o eletrodo terra posicionado na região frontal e o eletrodo de referência na orelha. Os eletrodos ativos foram posicionados sobre a córnea utilizando-se hidroxipropil-metilcelulose a 2,5% para registro bilateral simultâneo das respostas elétricas da retina. Foi utilizado equipamento de eletrofisiologia com cúpula de Ganzfeld e estimulador fotópico (Espion 2, Diagnosis LCC, Littleton-Massachusetts, Estados Unidos da América). O pico de resposta dos bastonetes e a resposta escotópica máxima foram obtidas utilizando-se estímulos de intensidade de 0,001 cd-s/m² e 3 cd-s/m², respectivamente em ambiente escuro. ⁽¹⁰²⁾ Os flashes foram repetidos com intervalo de um minuto até que ondas consistentes fossem obtidas. Foram analisadas as amplitudes das ondas *a* e *b*, que representam a atividade de fotorreceptores e da retina interna, respectivamente. Foi também analisado o tempo de culminação da onda *b* para detecção de disfunção na condução do estímulo elétrico retiniano. Os valores médios de amplitude das ondas *a* e *b* e do tempo de culminação da onda *b* foram estabelecidos através da média de seis respostas consecutivas.

Os valores de ondas obtidos no grupo 1 (DFPE) e no grupo 3 (DFPE + óleo de silicone) foram registrados 1, 3 e 6 meses após procedimento cirúrgico, bem

como 1 mês após remoção dos líquidos e foram comparados com a resposta do olho contralateral não operado (controle) pelo teste *t* pareado e com valores pré-operatórios referentes ao olho estudado através do teste de análise de variância simples (one-way ANOVA) seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Como a variabilidade na amplitude do eletrorretinograma entre os olhos direito e esquerdo em determinado dia se mostrou menor que dia a dia na amplitude do mesmo olho ⁽¹⁰²⁾, o olho contralateral serviu como importante grupo controle não operado nestes experimentos. Por fim, os grupos 1, 2 e 3 também foram comparados com o grupo 4 utilizando os testes descritos acima para verificar variação das amplitudes de onda *a* e onda *b*.

3.6.6 A enucleação

A indução anestésica foi feita com injeção intramuscular de ketamina (35mg/kg) e xylazina (10mg/kg) e, após punção da veia lateral da orelha do animal, mantida com tiopental sódico (10mg/kg) endovenoso. Quando necessário, a dose do tiopental foi progressivamente aumentada até que fosse atingido o plano anestésico adequado. Foi, novamente, considerada a profundidade cirúrgico-anestésica ideal quando, após provocação de estímulo doloroso na pata do animal, não foi percebido nenhum tipo de contração muscular ou lacrimejamento, garantindo, assim, total analgesia trans-operatória. ⁽¹⁰⁰⁾

Foi feita, então, cuidadosa enucleação dos dois bulbos oculares que, foram imediatamente banhados com solução salina balanceada e armazenados em solução de fixação contendo paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M com pH de 7,4.

3.6.7 A eutanásia

Após a enucleação dos dois bulbos oculares, ainda com o animal sob anestesia geral, foi realizado uma injeção endovenosa de pentobarbital

(250mg/kg) levando ao falecimento do animal, confirmada pela ausência de batimentos cardíacos e movimentos respiratórios.

3.7 A ANÁLISE HISTOLÓGICA DA RETINA

Os olhos enucleados foram deixados na solução de fixação por 24 horas. A seguir, foram desidratados por imersão em série crescente de etanol de 50, 70, 90 e 100% e depois incluídos em parafina.

Os blocos foram levados ao micrótomo e cortados com 5µm de espessura em sentido sagital orientados pelo nervo óptico até uma distância de 3 diâmetros de disco do nervo óptico, sendo, posteriormente corados com Hematoxilina-Eosina.

Foi realizado, então, análise histológica em microscopia óptica no microscópio Zeiss Axioplan 2 com sistema de captura de imagens AxioPhot2 através do software analySIS Imager Zeiss .

Os seguintes aspectos histológicos foram avaliados:

1 - Descrição morfológica das camadas da retina neurosensorial e do epitélio pigmentado da retina.

2 - Medidas da espessura do epitélio pigmentado da retina, da camada de fotorreceptores, da camada nuclear externa, da camada nuclear interna e do número de estratos celulares da nuclear externa.

Uma lesão sobre os fotorreceptores foi definida como a diminuição do número de estratos celulares e espessura da camada nuclear externa associada à diminuição da espessura da camada de fotorreceptores (atrofia).

3.8 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após coleta dos resultados, os dados foram atribuídos a cada olho de coelho dentro dos grupos de estudo. Os resultados das variáveis contínuas foram expressos por suas médias aritméticas e respectivos desvios-padrão ou por suas medianas e distâncias interquartílicas e os de variáveis categóricas por suas respectivas frequências absolutas e relativas.

Foram utilizados os testes de análise de variância (ANOVA), o teste t de Student para amostras pareadas e não pareadas na avaliação de possíveis diferenças entre médias e o teste de Newman-Keuls para avaliação de diferenças entre medianas. O teste do qui-quadrado avaliou possíveis diferenças entre frequências. Para realização dos teste estatísticos foi considerado uma significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

O grupo controle não operado, composto por treze olhos de treze coelhos, apresentou valor médio de peso de 2512,3 gramas. **(Tabela 5)**

Tabela 5. Distribuição dos olhos dos coelhos não operados com respectivo peso

COELHO	PESO	OLHO
1	2080	E
2	2460	D
3	2670	E
4	2650	E
5	2800	E
6	2410	E
7	2130	E
8	2320	D
9	2940	E
10	2660	E
11	2380	D
12	2810	E
13	2350	D

Legenda:

D = Direito

E = Esquerdo

O grupo controle operado, grupo 4, em que foi realizado vitrectomia e conservado com solução salina balanceada, composto por dois olhos de dois coelhos, apresentou valor médio de peso de 2580 gramas. O grupo 1 em que foi realizado vitrectomia e injeção intra-vítreo de 0,8 a 1ml de DFPE, composto de quatro olhos, apresentou valor médio de peso de 2465 gramas. O grupo 2 em que foi realizado vitrectomia e injeção intra-vítreo de 0,8 a 1,5ml de DFPE, composto de quatro olhos, apresentou valor médio de peso de 2415 gramas. O grupo 3 em que foi realizado vitrectomia e injeção intra-vítreo de 1,0 ml de DFPE e 0,2ml de

óleo de silicone, composto de três olhos, apresentou valor médio de peso de 2660 gramas.

A análise dos efeitos causados pela injeção intra-vítrea foram divididos em dois grupos: uns relacionados ao procedimento e outros relacionados ao agente tamponante.

4.1 OS EFEITOS DO PROCEDIMENTO DE VITRECTOMIA E INJEÇÃO DO COMPOSTO EM OLHOS DE COELHOS ALBINOS

Nos treze olhos submetidos à injeção intra-vítrea:

- Não houve caso de falecimento ou doença sistêmica nos coelhos.
- Não houve opacificação dos meios sugestiva de turvação vítrea associada à endoftalmite.
- Reação de câmara anterior com células foi observada em seis olhos (46,15%), sendo dois olhos do grupo 1; três olhos do grupo 2 e um olho do grupo 3, que regrediram espontaneamente entre 7 a 10 dias.
- Não houve caso de descolamento de retina em nenhum dos olhos do estudo.
- Em seis olhos (46,15%), três olhos do grupo 1; dois olhos do grupo 2 e um olho do grupo 3, houve surgimento de edema de córnea súbito e transitório logo após a realização da injeção intra-vítrea. A oftalmoscopia binocular indireta após as injeções, no entanto, confirmou o fluxo sanguíneo normal pela artéria central da retina.
- Quatro olhos (30,76%), um olho do grupo 1; dois olhos do grupo 2 e um olho do grupo 4, apresentaram hemorragia subconjuntival localizada ou no quadrante temporal superior ou inferior.
- Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na pressão intraocular entre os olhos estudados (**Fig. 1**)
- DFPE foi observado ocupando porção inferior e superior da cavidade vítrea. Nos grupos 1 e 2, dois olhos apresentaram 50% da

cavidade preenchida por DFPE, e três olhos no grupo 3. Preenchimento de DFPE entre 20% e 50% foi observado em dois olhos dos grupos 1 e 2.

- Não houve caso de opacificação na córnea ou cristalino que inviabilizasse o adequado acompanhamento do fundo de olho pela oftalmoscopia binocular indireta. Em cinco olhos (38,46%), um olho do grupo 1; um olho do grupo dois; dois olhos do grupo 3 e um olho do grupo 4, houve opacificação localizada do cristalino.
- DFPE apresentou pequena inflamação na cavidade vítrea em um olho do grupo 1, 2 e 3.
- Dispersão de líquido apareceu duas semanas após procedimento e, durante o seguimento, o tamanho da bolha de agente tamponante permaneceu estabilizado. **(Fig.2A)**
- Catarata subcapsular posterior apareceu em olhos dos grupos 1, 2 e 3, principalmente nos olhos que tinham maior quantidade de DFPE da cavidade vítrea (>50%).**(Fig.2B)**
- Debris celulares foram observados na interface entre DFPE e fluido fisiológico em seis olhos, dois olhos do grupo 1, um olho do grupo dois, um olho do grupo 3 e dois olhos do grupo 4, permanecendo inalterado nos primeiros seis meses. **(Fig.2C)**

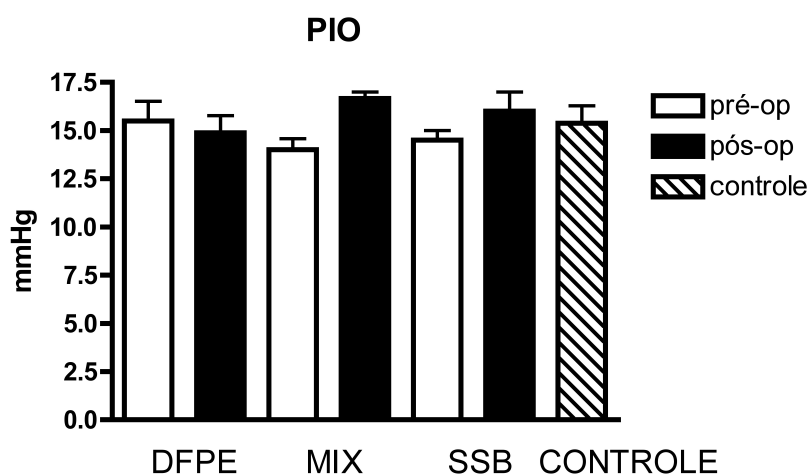


Fig. 1. Pressão intraocular (PIO) nos grupos com DFPE (grupo 1 e 2), MIX (DFPE +OS)(grupo 3), SSB (grupo 4) e controle.

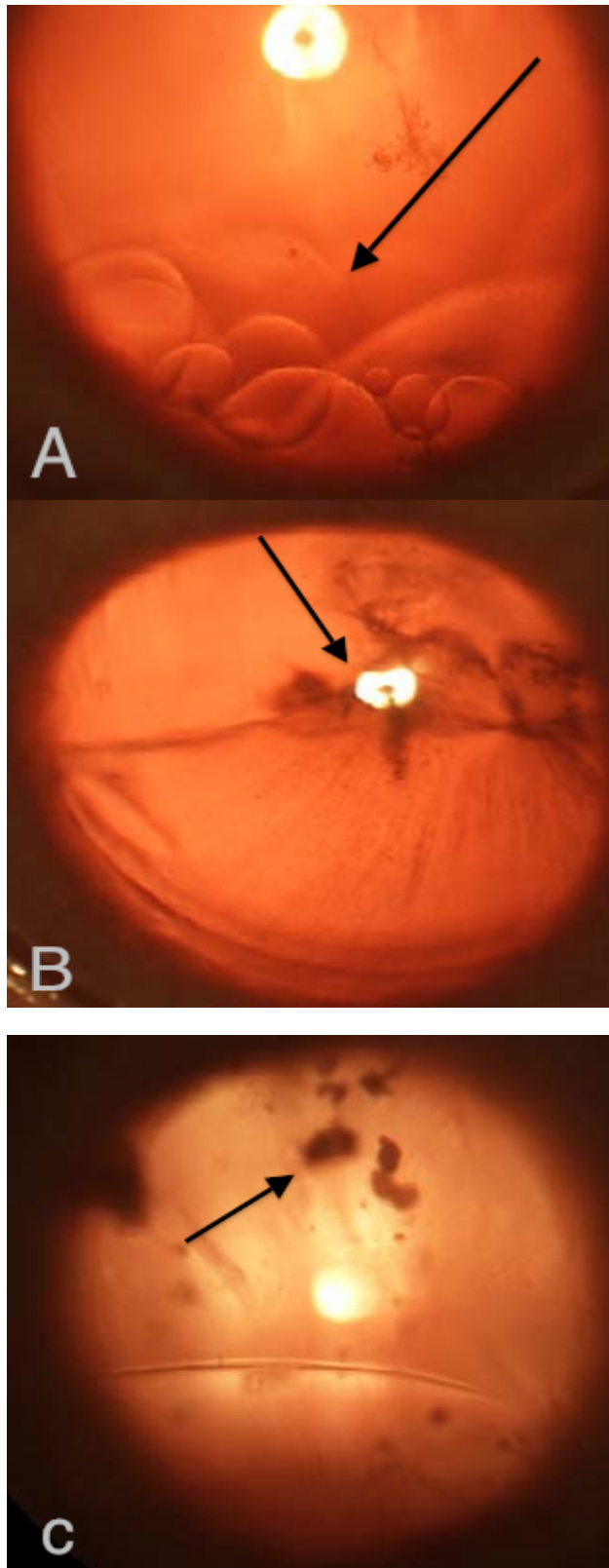


Fig. 2. Fotografias do fundo de olho dos coelhos com DFPE intra-vítreo. Achados clínicos incluem dispersão de líquido (A) formação de catarata (subcapsular posterior) (B) e acúmulo de debris celulares (C).

4.2 OS EFEITOS DO COMPOSTO EM OLHOS DE COELHOS ALBINOS: ANÁLISE ELETORRETINOGRÁFICA

Nos intervalos de 1, 3, 6, 12 meses de seguimento após injeção dos mesmos e 1 mês após retirada, foi analisada a tolerância retiniana ao substituto vítreo em estudo comparando os eletrorretinogramas escotópicos dos olhos injetados do grupo 1, 2 e 3 com o grupo 4, bem como com o olho não operado de cada grupo.

Os grupos 1, 2 e 3 não mostraram diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) no tempo de culminação das ondas *b*, bem como na amplitude da onda *a* quando comparado ao grupo 4 e quando comparado com o olho contralateral não operado de cada grupo.

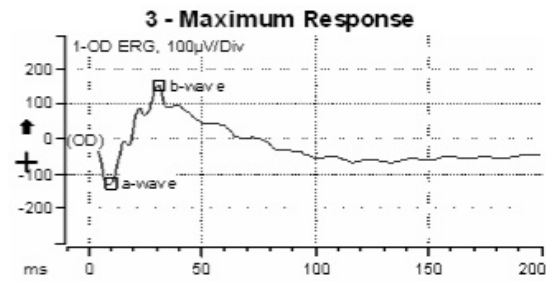
As amplitudes de onda *b* dos grupos 1 e 2 estavam aumentadas nos intervalos de 1, 3 e 6 meses de seguimento após procedimento com diferença estatística significativa quando comparados com o grupo 3 ($p<0,05$), grupo 4 ($p<0,001$) e olho contralateral não operado ($p<0,001$); porém não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre o grupo 2 comparados ao grupo 4 ou olho contralateral não operado de cada grupo.

Após 1 mês de remoção do substituto vítreo, independente de seis ou doze meses de acompanhamento, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$) entre os grupos 1, 2 e 3 quando comparados com o grupo 4 ou olho contralateral não operado de cada grupo.

(Fig. 3 e 4)

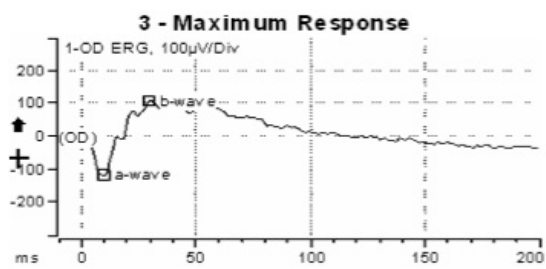
DFPE

Pré op



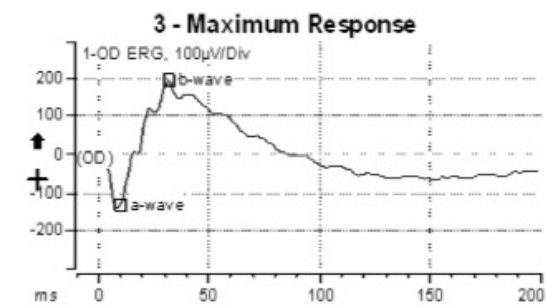
SSB

Pré op



DFPE

Pós op



SSB

Pós op

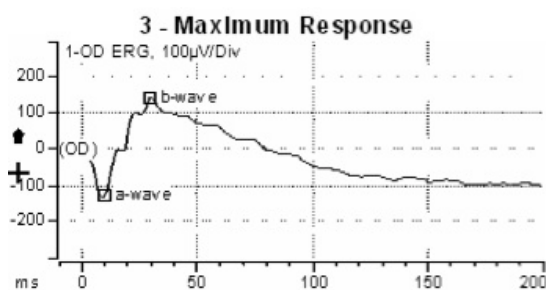


Fig. 3. Resposta do ERG nos olhos de coelhos com DFPE (n=8) e SSB (n=2) com 6 meses de acompanhamento.

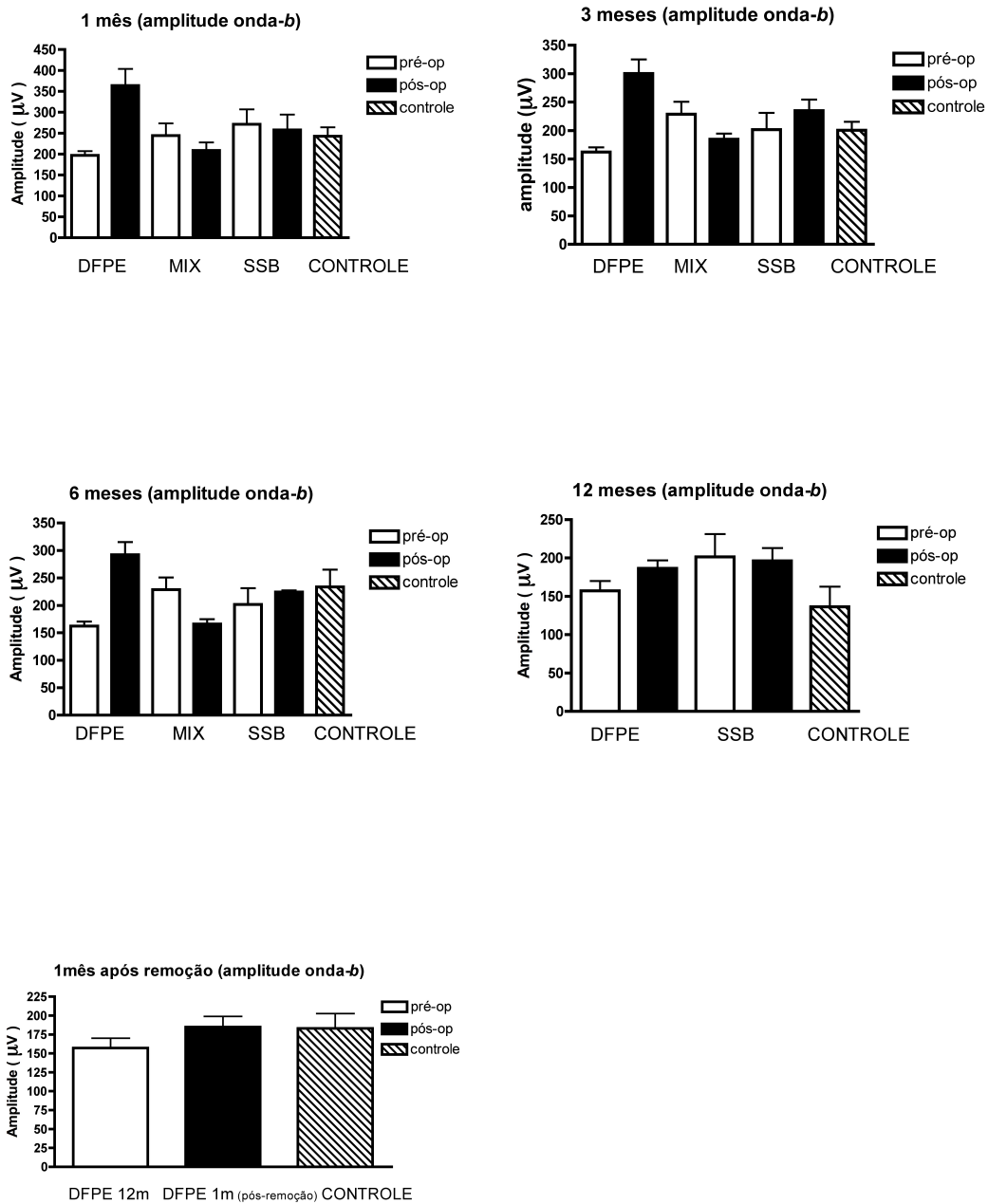


Fig. 4. Análise eletrorretinográfica, amplitude onda-b, dos olhos dos coelhos dos grupos 1, 2, 3 e 4 acompanhados por 1, 3, 6, 12 meses de pós-operatório e 1 mês após remoção do líquido.

4.3 OS EFEITOS DO COMPOSTO EM OLHOS DE COELHOS ALBINOS: ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.3.1 GRUPO CONTROLE:

No grupo em que não foi realizada injeção intra-vítrea, foram observados nas camadas de fotorreceptores e nuclear externa pequenas áreas de vacuolização ou separação dos segmentos externos, porém sem aumento ou diminuição da espessura da mesma, o que foram considerados artefatos. A camada nuclear interna apresentou vacúolos formados no processo de preparação da peça. O epitélio pigmentado da retina mostrou-se como uma camada pigmentar contínua, sem pontos de descontinuidade. Pequenas áreas de descolamento foram consideradas artefatos do processo de fixação e inclusão na parafina.

4.3.2 GRUPOS DE ESTUDO:

Após realização do estudo eletrorretinográfico, um mês após remoção dos agentes tamponantes, a avaliação histológica foi conduzida através de microscopia óptica onde foi observado que, embora não houvessem mudanças na espessura da camada nuclear externa entre os grupos de estudo e controle, perdas ocasionais dos núcleos dos fotorreceptores ocorreram na retina inferior de dois olhos injetados, um olho do grupo 1 e um olho do grupo 3.

Vacuolizações na retina interna e irregularidade na membrana limitante interna foram encontradas em dois olhos do grupo 2. Esses artefatos provavelmente são relacionados à cirurgia propriamente dita e já foram relatados antes. ⁽¹⁰³⁻¹⁰⁷⁾

Foram observados espessamento da retina inferior em um olho do grupo 1, dois olhos do grupo 2 e um olho do grupo 3 quando comparados com o grupo 4 e controle contralateral.

A retina interna dos olhos injetados dos grupos 1, 2 e 3 permaneceu preservada durante a duração de todo experimento, apresentando apenas vacuolizações esparsas. Não foi observado líquido nas camadas internas da retina em nenhum grupo experimental.

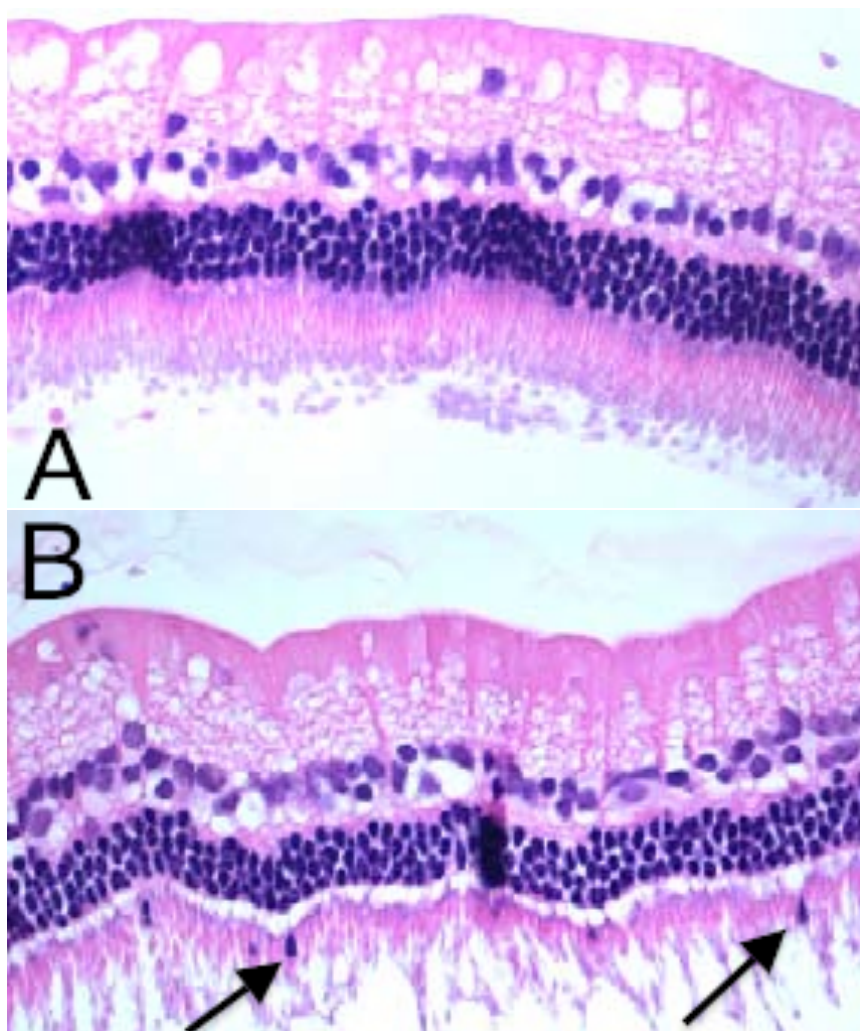


Fig. 5. Microfotografia da lâmina para análise histológica da retina neurosensorial após 6 meses de seguimento com DFPE intra-vítreo. (A) Retina superior com vacúolos na retina interna por artefatos (magnificação - 40x), (B) Retina inferior. Espessamento da retina interna com pouca migração de fotorreceptor (setas) sem afinamento da camada nuclear externa quando comparado retina inferior com retina superior (magnificação - 40x).

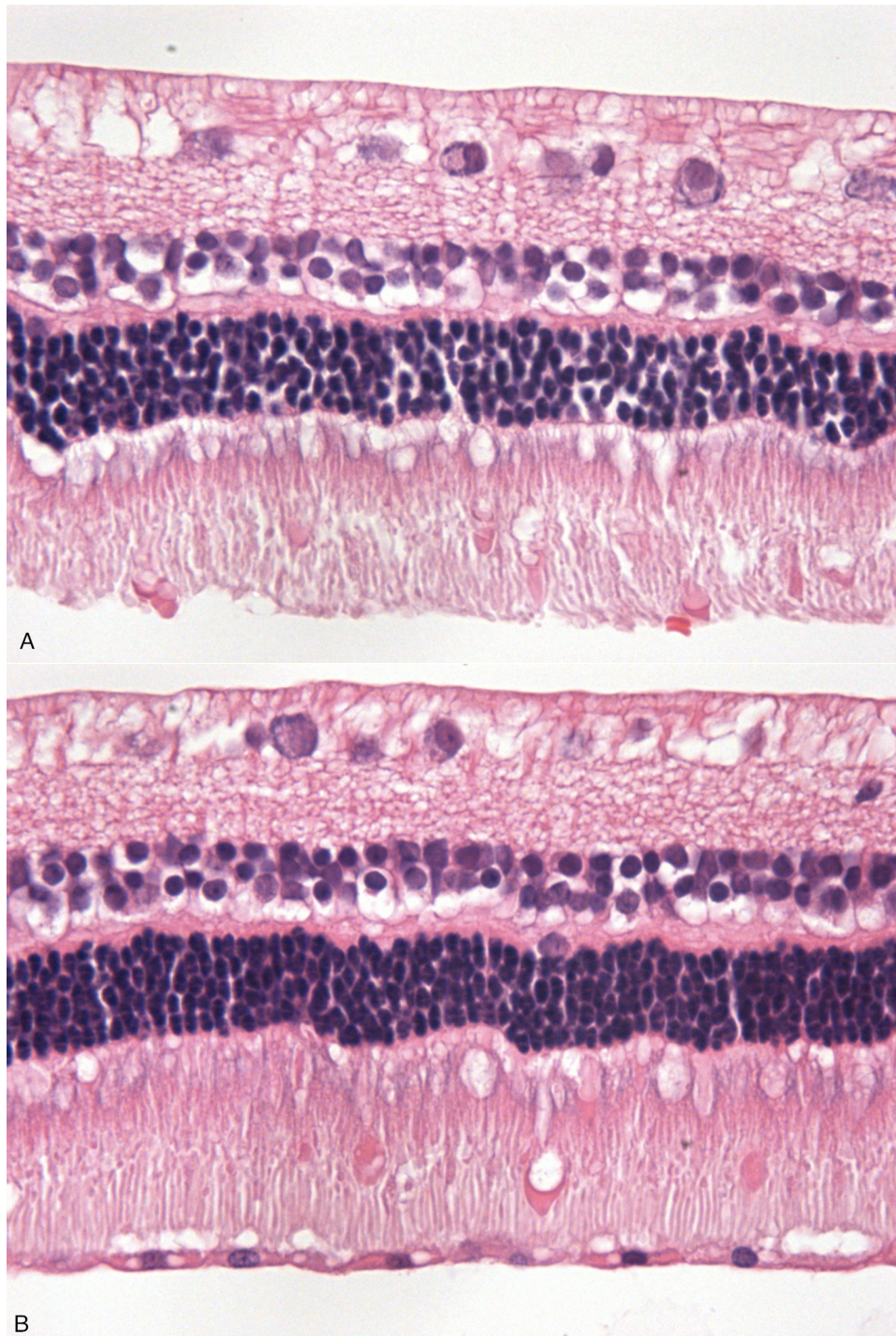


Fig. 6. Microfotografia da lâmina para análise histológica da retina neurossensorial após 12 meses de DFPE intra-vítreo seguido de 1 mês depois da remoção do líquido. (A) Retina superior (magnificação - 63x), (B) Retina inferior. Observada semelhança de espessura entre as retinas internas inferior e superior (magnificação - 63x).

5 DISCUSSÃO

5.1 A INJEÇÃO INTRA-VÍTREO EM OLHOS DE COELHOS ALBINOS

Injeções de fluidos na cavidade vítrea são executadas como técnicas auxiliares em cirurgia vitreorretiniana. Essas substâncias, conhecidas como substitutos vítreos ou agentes tamponantes, podem ser usadas no intra-operatório. Após a cirurgia para reparar rasgos na retina ou descolamentos, os cirurgiões também utilizam frequentemente os agentes tamponantes (AT) no pós-operatório para ajudar a manter ou apoiar a reinserção cirúrgica da retina. ^(69, 70) Apesar de se mostrarem seguras, existem relatos de complicações relacionadas à injeção intra-vítrea no tratamento de diversas doenças vitreorretinianas e o uso do substituto vítreo na oftalmologia deve seguir os protocolos da boa prática clínica, sendo a adequada anti-sepsia e a adequação de normas para injeção intra-vítrea eficazes na redução de endoftalmite associada ao procedimento. ⁽¹⁰¹⁾

Neste estudo, o procedimento de injeção intra-vítrea em olhos de coelhos não levou a efeitos clínicos adversos relevantes no pós-operatório. A presença de opacificação do cristalino localizada foi ocasionada, possivelmente, pelo turbilhonamento de solução salina balanceada através da cânula de infusão e pelo toque no cristalino durante o procedimento. Esta opacificação local não impediu o acompanhamento adequado da retina do animal.

O edema de córnea, surgido após procedimento cirúrgico, foi secundário ao aumento da pressão intraocular, uma vez que no segundo exame pós-operatório não fora evidenciado edema corneano.

Na fase do estudo piloto do trabalho, foi levantada a possibilidade de um volume maior do líquido em estudo ser responsável por danos estruturais à retina neurossensorial e epitélio pigmentar da retina e tal fato poder ser falsamente atribuído ao agente em estudo (DFPE). A análise histológica cuidadosa dos olhos que não realizaram injeção (grupo controle não operado) e dos olhos que receberam SSB (grupo controle operado) mostrou que o volume

injetado não foi fator determinante aos danos estruturais à RNS e EPR de olhos de coelhos.

A ausência de dano isquêmico secundário ao procedimento cirúrgico foi confirmada com a verificação da existência de permeabilidade da artéria central da retina através da oftalmoscopia binocular indireta.

Não houve nenhum caso de endoftalmite ou inflamação intraocular grave. Isso se deve à adoção dos cuidados recomendados pela melhor prática clínica, hoje existentes, para injeções intra-vítreas. Os dados do estudo sugerem que a injeção do substituto vítreo e vitrectomia seja um procedimento clinicamente seguro, podendo ser considerado reprodutível em modelos experimentais para pesquisa de toxicidade retiniana de diferentes substitutos vítreos em animais.

5.2 OS EFEITOS DO COMPOSTO EM OLHOS DE COELHOS ALBINOS

Neste estudo, onze olhos de coelhos albinos receberam injeção intra-vítreo de éter decafluoro-di-n-pentil (DFPE) com variação de volume de 0,8 a 1,5ml, sem diferenças significante de peso, divididos em quatro grupos onde foram injetados: DFPE, combinação de DFPE e óleo de silicone (OS) numa proporção de 20% do líquido injetado e solução salina balanceada. Os olhos dos animais foram acompanhados por intervalo de 6 meses, para olhos com combinação de DFPE e OS, e 12 meses para olhos com DFPE puro e solução salina balanceada.

Neste estudo optou-se por trabalhar com coelhos pois estes têm o olho consideravelmente maior que o dos camundongos, o que proporciona injeções intra-vítreo com volume semelhante aquelas feitas em seres humanos, e pela maior facilidade em mantê-los em ambientes experimentais quando comparados a porcos e macacos. Os coelhos vêm sendo usados como modelo animal para investigação da toxicidade retiniana a diferentes substitutos vítreos. (63, 89, 95, 104, 106, 107)

A gravidade atmosférica é considerada fator importante para um bom substituto vítreo que, além de ser compatível com os tecidos oculares, deve

preencher toda a cavidade vítrea com pressões iguais superior e inferiormente. A partir disto, um tamponamento mais pesado que a água poderia ser uma ferramenta extremamente útil para evitar a recorrência do descolamento inferior da retina. ⁽¹⁰⁸⁾

A combinação de líquidos com baixa e alta gravidade específica tem sido estudada na tentativa de solucionar o tamponamento e apoio mecânico nas áreas superiores e inferiores da retina simultaneamente. A mistura resultaria em bolha única opticamente clara seguindo suas devidas proporções. ⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾

Para este estudo foi feita uma mistura específica em volume composta de 80% de DFPE e 20% de óleo de silicone com 5000 centistokes. Esta proporção foi feita a partir dos dados das duas substâncias na tentativa de obter uma mistura estável e transparente à temperatura de estocagem e do corpo que é fundamental para fins cirúrgicos para obter uma densidade suficiente para garantir o efeito de tamponamento na retina inferior. A mistura foi obtida por agitação do óleo de silicone e DFPE manualmente, dando uma mistura clara e estável, graças à solubilidade das duas substâncias na proporção certa. A baixa viscosidade desta mistura facilita a injeção, que pôde ser realizada tanto com uma bomba ativa ou manualmente com um seringa e uma cânula de duplo-lúmen, permitindo que a mistura seja injetada em uma maneira similar ao perfluorcarbono líquido quando injetado.

Um dos princípios que norteiam o desenvolvimento de qualquer procedimento cirúrgico é a busca de técnicas menos invasivas que possam atingir o mesmo objetivo com resultados similares ou melhores. A cirurgia de vitrectomia utilizando pequena incisão vem ganhando mais adeptos com o avanço da tecnologia empregada, mostrando resultados promissores com recuperação cirúrgica mais rápida, proporcionando um maior conforto pós-operatório. ^(112, 113)

A vitrectomia com pequena incisão permitiu boa utilização do DFPE com fácil remoção ao final do estudo. Os resultados histopatológicos revelaram aumento da espessura retiniana interna associada à colocação de DFPE. Este acontecimento pode ter relação com resposta inflamatória envolvendo as células

de Müller que foram corroborados pelos achados do estudo eletrofisiológico mostrando mudanças na atividade da retina interna, embora estas alterações não tenham sido tão pronunciadas como relatado por outros líquidos parcialmente fluorados. ⁽⁸⁹⁾

Com estes resultados, o DFPE pode ser sugerido como um agente de tamponamento, seja como mistura solúvel com óleo de silicone ou sozinho, que pode ser deixado no olho no pós-operatório por períodos superiores a 1 mês até cerca de um ano, sem ter um efeito negativo significativo sobre os olhos.

A tolerância da retina ao DFPE é demonstrada pela ausência de efeitos adversos significativos durante o seguimento. Por exemplo, figuras 3 e 4 mostram que, após 6 meses no olho, o DFPE não apresentou qualquer efeito negativo, como mostrado pela onda-*b*. Além disso, o menisco do agente tamponante manteve-se coerente, não mostrando qualquer tendência para emulsificar ou partir-se em gotas, e não mostrou qualquer nebulosidade o que poderia ter ocorrido como resultado de uma reação adversa fisiológica. Importante ressaltar que os olhos com DFPE não apresentaram diferenças estatisticamente significativas de função ocular quando comparados aos olhos que foram mantidos com solução salina balanceada por seis meses de seguimento.

Alguns autores sugerem que algum grau de efeitos negativos são aceitáveis diante da retina reparada. ^(70, 95, 96, 102) Em um aspecto, o efeito negativo sobre o olho compreende um afinamento da camada plexiforme externa da retina inferior. Em outro aspecto, o efeito negativo pode incluir: deslocamento do núcleo dos fotorreceptores, distorção dos segmentos externos dos fotorreceptores, o estreitamento da camada plexiforme externa, e hipertrofia da camada do EPR. ^(63, 88, 89, 95, 114, 115) Nenhum desses efeitos negativos foi observado neste estudo.

Éteres parcialmente fluorados, que tem uma gravidade específica entre $1,1 \text{ g cm}^{-3}$ e $1,5 \text{ g cm}^{-3}$ são adequados para corrigir as deficiências de líquidos de silicone e perfluorocarbono quando eles são usados como agentes de tamponamento. ^(62, 63, 88, 89, 95) As misturas solúveis de DFPE podem ser

planejadas para terem uma gravidade específica maior que da água evitando-se problema de flutuabilidade, tendo ainda um peso específico que não seja tão alto a ponto de danificar a retina posterior pela força gravitacional. ⁽⁹⁵⁾

Através deste estudo, foi demonstrado que as misturas também podem ser planejadas para ter uma gravidade específica de tal forma que possa agir como um tamponamento tanto para retina superior como inferior. A redução de peso em comparação com perfluorcarbono líquido estudado por Chang *et al.* ⁽⁹⁵⁾ diminuem as chances de dano à retina por fator mecânico a longo prazo.

O DFPE é estável à temperatura ambiente, calor de até 95°C e à luz solar. Além do mais, uma mistura de DFPE e silicone (20% de silicone e 80%DFPE) é estável por meio de ciclagem térmica diária (2º a 40ºC) por pelo menos 18 meses. Com relação a insolubilidade na água, uma gota de DFPE (cerca de 50ppm) adicionado a um litro de água permanece visível, inalterado e não dissolvido por longos períodos de tempo (pelo menos, superior a 8 meses). Além disso, a partir da análise por cromatografia gasosa, o DFPE recuperado do olho após um mês de permanência, mostrou alterações na composição do DFPE inferiores a 0,05%, o que foi, provavelmente, devido ao seu contato com vários materiais externos, tais como seringas e filtros antes da sua utilização.

Perfluorocarbonos líquidos (PFCL) têm uma maior força de aplanção sobre retina descolada devido ao seu maior peso ⁽⁹⁵⁾ e, como o PFCL, os éteres parcialmente fluorados são geralmente melhor adaptados e mais vantajosos para tamponamento pós-operatório. Com o resultado demonstrado, o DFPE pode ser sugerido como agente de tamponamento pós-operatório no olho por até 1 ano. Isso permitiria o uso da vitrectomia com pequena incisão, sem sutura para cirurgia de PVR e posterior remoção do substituto. A estrutura do DFPE sugere menos reatividade e é melhor tolerada quando comparada com outras substâncias parcialmente fluoradas em olhos de coelhos, mas ainda provoca pequenas alterações histológicas durante os primeiros 12 meses estudados. O exame histopatológico confirma o espessamento das camadas internas da retina inferior. Observações semelhantes com outros líquidos parcialmente fluorados indicam alteração com um mês de permanência até 12 meses. ^(89,95)

Neste estudo, o DFPE sugere ser adequado para utilização em qualquer tratamento de alteração retiniana, tais como: tratamento da proliferação vitreoretiniana, descolamento da retina do paciente diabético, descolamento de retina por rotura gigante, descolamento de retina secundário a trauma, hemorragia sub-retiniana, hemorragia vítrea e descolamento de retina secundário a buraco macular. (97, 116-118)

Diversos trabalhos (89, 95, 96, 119-121) mostraram que os substitutos vítreos considerados ideais para uso possuem características similares ao DFPE, onde estão incluídos: a) clareza e transparência, b) inércia química e biológica, c) índice de refração e densidade semelhante ao vítreo natural, d) rigidez suficiente para agir como um agente de tamponamento, e) capacidade para permitir a transferência de metabólitos, f) características não-absorvíveis e não-biodegradáveis, g) composição hidrófila e habilidade para ser injetado através de agulha com pequeno calibre.

Portanto, tendo em vista estes achados, considera-se que o DFPE demonstrou o mínimo de efeitos adversos na retina de coelhos. Assim, o DFPE, e suas misturas, podem ser deixadas no olho, por até um ano, no pós-operatório, devido à sua compatibilidade com o olho melhorando assim o sucesso de reaplicar a retina e os procedimentos de cura.

5.3 PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Este trabalho mostrou a segurança da injeção intra-vítreo de éter decafluoro-di-n-pentil, um agente tamponante que pode ser utilizado como substituto vítreo por um período maior que o gás. Planeja-se, agora, o estabelecimento de protocolos de pesquisa para avaliação em seres humanos.

2. Este modelo animal é reprodutível e seguro para realização de injeções intra-vítreo em ambiente experimental, podendo ser utilizado para o teste de novos agentes a serem usados no tratamento do descolamento de retina do globo ocular.

6 CONCLUSÕES

1. O DFPE, como substituto vítreo, demonstrou ser bem tolerado com mínimo efeito adverso ocular pelo exame clínico, histológico e eletrorretinográfico em coelhos albinos, não sendo associada a complicações clínicas significativas pós-operatórias
2. O DFPE não demonstrou alterações histológicas significativas em olhos de coelhos albinos após 12 meses de permanência intra-vítreo.
4. Não foram observados alterações eletrorretinográficas significativas em olhos de coelhos albinos que permaneceram 1, 3, 6 e 12 meses com DFPE intra-vítreo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dantas AM. Olho. Anatomia Funcional do Olho e seus Anexos: Revinter; 2002. p. 65-252.
2. Freitas RS, Gutfilen B, da Fonseca LM, Bernardo-Filho M. Evaluation of ^{99m}technetium-radiopharmaceutical binding to blood elements using different trichloroacetic acid concentrations. *Yale J Biol Med.* 1996 Nov-Dec;69(6):483-8.
3. Fonseca ME, Mason M, Ochoa R, Hernandez VM, Zarate A. [Changes in molecular forms of sex hormone binding globulin during menstrual cycle and menopause]. *Ginecol Obstet Mex.* 1996 Nov;64:508-16.
4. Fonseca E, Cruz JJ, Duenas A, Gomez A, Sanchez P, Martin G, et al. Do the conventional clinicopathologic parameters predict for response and survival in head and neck cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy? *Tumori.* 1996 Nov-Dec;82(6):560-6.
5. Zimmerman RL. In vivo measurements of the viscoelasticity of the human vitreous humor. *Biophys J.* 1980 Mar;29(3):539-44.
6. Lopes A, Hidalgo GS, Kowalski LP, Torloni H, Rossi BM, Fonseca FP. Prognostic factors in carcinoma of the penis: multivariate analysis of 145 patients treated with amputation and lymphadenectomy. *J Urol.* 1996 Nov;156(5):1637-42.
7. Garcia Ortiz JC, Moyano C, Fonseca JL, Bellido J. [The Chinese restaurant syndrome]. *Med Clin (Barc).* 1996 Oct 19;107(13):518.
8. Fonseca E, Cruz JJ, Rodriguez CA, Gomez-Bernal A, Martin G, Sanchez P, et al. Neoadjuvant chemotherapy with continuous infusion of cisplatin and 5-fluorouracil, with or without leucovorin, for locally advanced nasopharyngeal carcinoma. *J Infus Chemother.* 1996 Fall;6(4):217-20.
9. Mino D, Wachter N, Amato D, Burbano G, Fonseca ME, Revilla C, et al. Insulin resistance in offspring of hypertensive subjects. *J Hypertens.* 1996 Oct;14(10):1189-93.
10. Da Silva LC, Madruga CL, Carrilho FJ, Pinho JR, Saez-Alquezar A, Santos C, et al. Spontaneous hepatitis B surface antigen clearance in a long-term follow-up study of patients with chronic type B hepatitis. Lack of correlation with hepatitis C and D virus superinfection. *J Gastroenterol.* 1996 Oct;31(5):696-701.
11. Ono SK, da Silva LC, Carrilho FJ, da Fonseca LE, Mendes LC, Madruga CL, et al. Clearance of hepatitis C viral RNA in cirrhotic patients with antiviral therapy. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 1996 Sep-Oct;51(5):180-3.
12. Nunes JF, Fonseca I, Soares J. Helioid inclusions in dedifferentiated acinic cell carcinoma of the parotid gland. *Ultrastruct Pathol.* 1996 Sep-Oct;20(5):443-9.
13. Fonseca V, Munshi M, Merin LM, Bradford JD. Diabetic retinopathy: a review for the primary care physician. *South Med J.* 1996 Sep;89(9):839-50.
14. Fonseca MS. [New drugs, new obstacles in the fight against HIV]. *Sidahora.* 1996 Aug-Sep:13-4.
15. Rezaei KA, Abrams, G.W. The History of Retinal Detachment Surgery. In: Kreissig I, editor. *Primary Retinal Detachment: Options for Repair.* Germany: Springer; 2005. p. 1-24.

16. Kanski JJ. Descolamento de retina. *Oftalmologia clínica: uma abordagem sistemática*. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 695-726.
17. Ávila MI, D. Descolamento de retina com proliferação vitreoretiniana e rotura gigante. *Vitrectomia 20, 23 e 25G*. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2010. p. 187-201.
18. Gonin J. *Le décollement de la rétine. Pathogénie - Traitement*. Lausanne: Libraire Payot & Cie; 1934.
19. Machemer R, Laqua H. Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). *Am J Ophthalmol*. 1975 Jul;80(1):1-23.
20. The Retina Society Terminology Committee. The classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology*. 1983 Feb;90(2):121-5.
21. Machemer R, Aaberg TM, Freeman HM, Irvine AR, Lean JS, Michels RM. An updated classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol*. 1991 Aug 15;112(2):159-65.
22. The Silicon Oil Study Group. Vitrectomy with silicone oil or perfluoropropane gas in eyes with severe proliferative vitreoretinopathy: results of a randomized clinical trial. *Silicone Study Report 2. Arch Ophthalmol*. 1992 Jun;110(6):780-92.
23. The Silicon Oil Study Group. Vitrectomy with silicone oil or sulfur hexafluoride gas in eyes with severe proliferative vitreoretinopathy: results of a randomized clinical trial. *Silicone Study Report 1. Arch Ophthalmol*. 1992 Jun;110(6):770-9.
24. Kon CH, Asaria RH, Occlleston NL, Khaw PT, Aylward GW. Risk factors for proliferative vitreoretinopathy after primary vitrectomy: a prospective study. *Br J Ophthalmol*. 2000 May;84(5):506-11.
25. Pastor JC. Proliferative vitreoretinopathy: an overview. *Surv Ophthalmol*. 1998 Jul-Aug;43(1):3-18.
26. Nagasaki H, Shinagawa K, Mochizuki M. Risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Prog Retin Eye Res*. 1998 Jan;17(1):77-98.
27. Mietz H, Heimann K. Onset and recurrence of proliferative vitreoretinopathy in various vitreoretinal disease. *Br J Ophthalmol*. 1995 Oct;79(10):874-7.
28. Anderson DH, Stern WH, Fisher SK, Erickson PA, Borgula GA. The onset of pigment epithelial proliferation after retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981 Jul;21(1 Pt 1):10-6.
29. Machemer R. Pathogenesis and classification of massive periretinal proliferation. *Br J Ophthalmol*. 1978 Nov;62(11):737-47.
30. Campochiaro PA. Pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy. In: Ryan SJ, editor. *Retina*. 4 ed. Missouri: Mosby-year Book Press; 2006. p. 2235-40.
31. Jousseaume AM, Kirchhof B, Schrage N, Ocklenburg C, Hilgers RD. Heavy silicone oil versus standard silicone oil as vitreous tamponade in inferior PVR (HSO Study): design issues and implications. *Acta Ophthalmol Scand*. 2007 Sep;85(6):623-30.
32. Unlu N, Kocaoglan H, Acar MA, Sargin M, Aslan BS, Duman S. Outcome of complex retinal detachment surgery after silicone oil removal. *Int Ophthalmol*. 2004 Jan;25(1):33-6.

33. Meng Q, Zhang S, Cheng H, Chen X, Jin Y. Long-term outcomes of Oxane Hd as intraocular tamponade in the treatment of complicated retinal detachment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2010 Aug;248(8):1091-6.
34. Duke-Elder S, Dobree, J.H . Detachment and folding of the retina. In: Duke-Elder, editor. *System of ophthalmology*. St. Louis: Mosby-Year Book; 1967. p. 816-22.
35. Wilkinson CP, Rice, T.A, . *Michels retinal detachment*. 2nd ed. St. Louis: Mosby; 1997.
36. Gonin J. *Bull Soc Franc Ophthal* 1920;33(1).
37. Gonin J. *Ann Oculist Paris* 1919. p. 281.
38. Schepens CL. A new ophthalmoscope demonstration. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1947;51:298-301.
39. Lincoff HA, Baras, I, McLean, J, . Modifications to the Custodis procedure for retinal detachment. *Arch Ophthalmol*. 1965;73:160.
40. Rosengren B. Ueber die Behandlung der Netzhautablosung mittelst Diathermie und Luftinjektion in den Glaskoerper. *Acta Ophthalmol*. 1938;16:3.
41. Lincoff H, Maisel JM, Lincoff A. Intravitreal disappearance rates of four perfluorocarbon gases. *Arch Ophthalmol*. 1984 Jun;102(6):928-9.
42. Norton EW. Intraocular gas in the management of selected retinal detachments. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1973 Mar-Apr;77(2):OP85-98.
43. Vygantas CM, Peyman GA, Daily MJ, Ericson ES. Octafluorocyclobutane and other gases for vitreous replacement. *Arch Ophthalmol*. 1973 Sep;90(3):235-6.
44. Cibis PA, Becker B, Okun E, Canaan S. The use of liquid silicone in retinal detachment surgery. *Arch Ophthalmol*. 1962 Nov;68:590-9.
45. Cibis PA. Symposium: Present Status of Retinal Detachment Surgery. Vitreous Transfer and Silicone Injections. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1964 Nov-Dec;68:983-7.
46. Cibis PA. Errors in the Management of Retinal Detachments. Complications Avoidable and Unavoidable. *Bibl Ophthalmol*. 1965;65:284-308.
47. Cibis PA. [Treatment of retinal detachment by injection of silicon oil into the vitreous body]. *Ber Zusammenkunft Dtsch Ophthalmol Ges*. 1965;66:433-4.
48. Cibis PA. Recent methods in the surgical treatment of retinal detachment: intravitreal procedures. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1965;85:111-27.
49. Scott JD. The treatment of massive vitreous retraction by the separation of pre-retinal membranes using liquid silicone. *Mod Probl Ophthalmol*. 1975;15:185-90.
50. Machemer R, Aaberg, T.M. *Vitrectomy*. 2nd ed. New York: Grune & Stratton; 1979.
51. Stilma JS, Koster R, Zivojnovic R. Radical vitrectomy and silicone-oil injection in the treatment of proliferative vitreoretinopathy following retinal detachment. *Doc Ophthalmol*. 1986 Dec 30;64(1):109-16.
52. Zivojnovic R, Mertens DA, Peperkamp E. [Liquid silicone in amotio surgery (II). Report on 280 cases - further development of the technic]. *Klin Monbl Augenheilkd*. 1982 Dec;181(6):444-52.
53. Gallemore RP, McCuenII, B.W. Silicone Oil in Vitreoretinal Surgey. In: Ryan SJ, editor. *Retina*: Elsevier; 2006. p. 2211-34.

54. Kasner D. Vitrectomy: a new approach to management of vitreous. *Highlights Ophthalmol.* 1969;11:304.
55. O'Malley C, Heintz RM, Sr. Vitrectomy with an alternative instrument system. *Ann Ophthalmol.* 1975 Apr;7(4):585-8, 91-4.
56. Machemer R, Buettner H, Norton EW, Parel JM. Vitrectomy: a pars plana approach. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1971 Jul-Aug;75(4):813-20.
57. Norton EW, Machemer R. A new approach to the treatment of selected retinal detachments secondary to vitreous loss at cataract surgery. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1971;69:63-70.
58. O'Malley C, Heintz RM. Vitrectomy via the pars plana--a new instrument system. *Trans Pac Coast Otoophthalmol Soc Annu Meet.* 1972;53:121-37.
59. Haidt SJ, Clark, L.C., Ginsberg, J.. Liquid perfluorocarbon replacement in the eye *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;22[Suppl]:223.
60. Chang S. Low viscosity liquid fluorochemicals in vitreous surgery. *Am J Ophthalmol.* 1987 Jan 15;103(1):38-43.
61. Chang S, Lincoff H, Zimmerman NJ, Fuchs W. Giant retinal tears. Surgical techniques and results using perfluorocarbon liquids. *Arch Ophthalmol.* 1989 May;107(5):761-6.
62. Chang S, Ozmert E, Zimmerman NJ. Intraoperative perfluorocarbon liquids in the management of proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol.* 1988 Dec 15;106(6):668-74.
63. Chang S, Zimmerman NJ, Iwamoto T, Ortiz R, Faris D. Experimental vitreous replacement with perfluorotributylamine. *Am J Ophthalmol.* 1987 Jan 15;103(1):29-37.
64. Ávila M, Isaac, D.L.C. *Vitrectomia 20,23 e 25G.* 1 ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica; Guanabara Koogan; 2010.
65. Stonehouse NJ, Scott DJ, Fonseca S, Murray J, Adams C, Clarke AR, et al. Molecular interactions in the RNA bacteriophage MS2. *Biochem Soc Trans.* 1996 Aug;24(3):412S.
66. Moran C, Carranza-Lira S, Ochoa R, Martinez JC, Herrera M, Fonseca E, et al. Gastrin levels in mothers and neonates at delivery in various perinatal conditions. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1996 Aug;75(7):608-11.
67. Hart DD, Fonseca DM. An important confluence for stream ecology. *Trends Ecol Evol.* 1996 Jul;11(7):272-3.
68. de Aretxabala X, Burgos L, Fonseca L, Silva J, Hebel E, San Martin R. [Pancreas divisium as a cause of chronic pancreatitis. Clinical case]. *Rev Med Chil.* 1996 Jul;124(7):855-8.
69. Peyman GA, Schulman, J.A. *Vitreous Substitute.* East Norwalk, Connecticut, USA: Appleton & Lange; 1995.
70. Foster WJ. Vitreous Substitutes. *Expert Rev Ophthalmol.* 2008 Apr;3(2):211-8.
71. Chang S, Coleman DJ, Lincoff H, Wilcox LM, Jr., Braunstein RA, Maisel JM. Perfluoropropane gas in the management of proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol.* 1984 Aug 15;98(2):180-8.
72. Chang S, Lincoff HA, Coleman DJ, Fuchs W, Farber ME. Perfluorocarbon gases in vitreous surgery. *Ophthalmology.* 1985 May;92(5):651-6.
73. Sergio MR, Godinho C, Guerra L, Agapito A, Fonseca F, Costa C. [TSH anti-receptor antibodies in Graves' disease]. *Acta Med Port.* 1996 Jul-Sep;9(7-9):229-31.

74. Fonseca T, Cortes P, Monteiro J, Salgado V, Ferro J, Franco AS, et al. [Acute cerebrovascular disorder and arterial hypertension. Prospective study with 248 patients]. *Rev Port Cardiol.* 1996 Jul-Aug;15(7-8):565-73, 47-8.
75. Fonseca C, Ceia F, Falcao F, Luis AS. [Clinical pharmacokinetics. Present and future]. *Acta Med Port.* 1996 Jul-Sep;9(7-9):185-6.
76. Carvalho A, Fonseca C, Falcao F, Pereira TA, Freitas O, Parrinha A, et al. [Individualized monitoring of the therapy with gentamycin using pharmacokinetic methods. Which method to choose?]. *Acta Med Port.* 1996 Jul-Sep;9(7-9):187-95.
77. Munoz FJ, Bellido J, Moyano JC, Alvarez M, Fonseca JL. Perioral contact urticaria from sodium benzoate in a toothpaste. *Contact Dermatitis.* 1996 Jul;35(1):51.
78. Franken RA, Nitrini G, Franken M, Fonseca AJ, Leite JC. [Nicotine. Actions and interactions]. *Arq Bras Cardiol.* 1996 Jun;66(6):371-3.
79. Carbonell GV, Fonseca BA, Figueiredo LT, Darini AL, Yanaguaita RM. Culture conditions affect cytotoxin production by *Serratia marcescens*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996 Dec 31;16(3-4):299-307.
80. Foster WJ, Chou T. Physical mechanisms of gas and perfluron retinopexy and sub-retinal fluid displacement. *Phys Med Biol.* 2004 Jul 7;49(13):2989-97.
81. Siqueira JF, Jr., De Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996 Jun;22(6):308-10.
82. Fonseca ME, Marcellino LH, Gander E. A rapid and sensitive dot-blot hybridization assay for the detection of citrus exocortis viroid in *Citrus medica* with digoxigenin-labelled RNA probes. *J Virol Methods.* 1996 Apr 5;57(2):203-7.
83. Fonseca W, Kirkwood BR, Barros AJ, Misago C, Correia LL, Flores JA, et al. Attendance at day care centers increases the risk of childhood pneumonia among the urban poor in Fortaleza, Brazil. *Cad Saude Publica.* 1996 Apr;12(2):133-40.
84. Mirchandani HG, McDonald G, Hood IC, Fonseca C. Heat-related deaths in Philadelphia--1993. *Am J Forensic Med Pathol.* 1996 Jun;17(2):106-8.
85. Felix A, El-Naggar AK, Press MF, Ordonez NG, Fonseca I, Tucker SL, et al. Prognostic significance of biomarkers (c-erbB-2, p53, proliferating cell nuclear antigen, and DNA content) in salivary duct carcinoma. *Hum Pathol.* 1996 Jun;27(6):561-6.
86. Montz R, Perez-Castejon MJ, Jurado JA, Martin-Comin J, Esplugues E, Salgado L, et al. Technetium-99m tetrofosmin rest/stress myocardial SPET with a same-day 2-hour protocol: comparison with coronary angiography. A Spanish-Portuguese multicentre clinical trial. *Eur J Nucl Med.* 1996 Jun;23(6):639-47.
87. Gabel VP, Kampik A, Gabel C, Spiegel D. Silicone oil with high specific gravity for intraocular use. *Br J Ophthalmol.* 1987 Apr;71(4):262-7.
88. Sparrow JR, Jayakumar A, Berrocal M, Ozmert E, Chang S. Experimental studies of the combined use of vitreous substitutes of high and low specific gravity. *Retina.* 1992;12(2):134-40.
89. Sparrow JR, Matthews GP, Iwamoto T, Ross R, Gershbein A, Chang S. Retinal tolerance to intravitreal perfluoroethylcyclohexane liquid in the rabbit. *Retina.* 1993;13(1):56-62.
90. Lopes A, Rossi BM, Fonseca FP, Morini S. Unreliability of modified inguinal lymphadenectomy for clinical staging of penile carcinoma. *Cancer.* 1996 May 15;77(10):2099-102.

91. Nicolau JE, Benard G, Fonseca LA, Casseb JS, Sato MN, Cianga M, et al. HIV heterosexual transmission to stable sexual partners of HIV-infected Brazilian hemophiliacs. *Sao Paulo Med J.* 1996 May-Jun;114(3):1186-9.
92. Fonseca I, Soares J. Basal cell adenocarcinoma of minor salivary and seromucous glands of the head and neck region. *Semin Diagn Pathol.* 1996 May;13(2):128-37.
93. Panadero MA, Cruz JJ, Gomez A, Fonseca E, Garcia MJ, Garcia J, et al. Mediastinal mass following chemotherapy in patients with Ewing sarcoma and osteosarcoma. *J Intern Med.* 1996 May;239(5):457-60.
94. Beneyto P, Alonso I, Perez TM, Lopez L, Fonseca A. Study of lens autofluorescence by fluorophotometry in pregnant patients with diabetes. *Ophthalmology.* 1996 May;103(5):822-6.
95. Chang S, Sparrow JR, Iwamoto T, Gershbein A, Ross R, Ortiz R. Experimental studies of tolerance to intravitreal perfluoro-n-octane liquid. *Retina.* 1991;11(4):367-74.
96. Velikay M, Wedrich A, Stolba U, Datlinger P, Li Y, Binder S. Experimental long-term vitreous replacement with purified and nonpurified perfluorodecalin. *Am J Ophthalmol.* 1993 Nov 15;116(5):565-70.
97. Chang S, Sparrow, J. Vitreous Substitute. In: Guyer DR, editor. *Retina - Vitreous - Macula*: W B Saunders Company; 1999. p. 1320-37.
98. Cristino JM, Calado E, Calheiros IM, Costa D, Costa MN, Diogo J, et al. [Multicenter study of isolated micro-organisms resistant to antimicrobials in 10 Portuguese hospitals in 1994]. *Acta Med Port.* 1996 Apr-Jun;9(4-6):141-50.
99. Colarinha P, Fonseca AT, Salgado L, Vieira MR. Diagnosis of malignant change in Paget's disease by Tl-201. *Clin Nucl Med.* 1996 Apr;21(4):299-301.
100. FONSECA NM. Anestesia em Coelhos. *Acta Cir Bras.* 1996;11(2):82-104.
101. Aiello LP, Brucker AJ, Chang S, Cunningham ET, Jr., D'Amico DJ, Flynn HW, Jr., et al. Evolving guidelines for intravitreal injections. *Retina.* 2004 Oct;24(5 Suppl):S3-19.
102. Lawwill T. Practical rabbit electroretinography. *Am J Ophthalmol.* 1972 Jul;74(1):135-41.
103. Ober RR, Blanks JC, Ogden TE, Pickford M, Minckler DS, Ryan SJ. Experimental retinal tolerance to liquid silicone. *Retina.* 1983;3(2):77-85.
104. Gonvers M, Hornung JP, de Courten C. The effect of liquid silicone on the rabbit retina. Histologic and ultrastructural study. *Arch Ophthalmol.* 1986 Jul;104(7):1057-62.
105. Hutton W, Fuller, DG., Snyder, WB. . Silicone oil for management of PVR: complication of six-month and two-year results. In: HM TFF, editor. *Proliferative Vitreoretinopathy (PVR)*. New York: Springer-Verlag; 1988. p. 166-8.
106. Doi M, Refojo MF. Histopathology of rabbit eyes with intravitreal silicone-fluorosilicone copolymer oil. *Exp Eye Res.* 1994 Dec;59(6):737-46.
107. Eckardt C, Nicolai U, Winter M, Knop E. Experimental intraocular tolerance to liquid perfluorooctane and perfluoropolyether. *Retina.* 1991;11(4):375-84.
108. Fanyao Q, Fonseca AL, Nunes OA. Hydrogenic impurities in a quantum well wire in intense, high-frequency laser fields. *Phys Rev B Condens Matter.* 1996 Dec 15;54(23):16405-8.

109. Krug LP, Lunge VR, Ikuta N, Fonseca AS, Cheinquer H, Ozaki LS, et al. Hepatitis C virus genotypes in Southern Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 1996 Dec;29(12):1629-32.
110. Hoerauf H, Kobuch K, Dresch J, Menz DH. Combined use of partially fluorinated alkanes, perfluorocarbon liquids and silicone oil: an experimental study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2001 Jun;239(5):373-81.
111. Guba SC, Fink LM, Fonseca V. Hyperhomocysteinemia. An emerging and important risk factor for thromboembolic and cardiovascular disease. *Am J Clin Pathol.* 1996 Dec;106(6):709-22.
112. Oliveira JF, Braga AC, Avila AS, Fonseca LM, Gutflen B, Bernardo-Filho M. Effect of *Thuya occidentalis* on the labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m. *Yale J Biol Med.* 1996 Nov-Dec;69(6):489-94.
113. Rouquayrol MZ, Correia LL, Barbosa LM, Xavier LG, Oliveira JW, Fonseca W. [Risk factors of stillbirths in Fortaleza-Brazil: a case-control study]. *J Pediatr (Rio J).* 1996 Nov-Dec;72(6):374-8.
114. Sparrow JR, Chang S, Vinals AF. Evaluation of the blood-aqueous barrier after vitreous replacement with perfluoropropane gas and liquid silicone. *Retina.* 1992;12(4):370-5.
115. Sparrow JR, Ortiz R, MacLeish PR, Chang S. Fibroblast behavior at aqueous interfaces with perfluorocarbon, silicone, and fluorosilicone liquids. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990 Apr;31(4):638-46.
116. Bourke RD. Perfluorocarbon heavy liquids. *Eye (Lond).* 1995;9 (Pt 3):v-vii.
117. Bourke RD, Cooling RJ. Perfluorocarbon heavy liquids. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1995 Aug;23(3):165-71.
118. Comaratta MR, Chang S. Perfluorocarbon liquids in the management of complicated retinal detachments. *Curr Opin Ophthalmol.* 1991 Jun;2(3):291-8.
119. Chirila TV, Tahija S, Hong Y, Vijayasekaran S, Constable IJ. Synthetic polymers as materials for artificial vitreous body: review and recent advances. *J Biomater Appl.* 1994 Oct;9(2):121-37.
120. Rofail M, Lee LR. Perfluoro-n-octane as a postoperative vitreoretinal tamponade in the management of giant retinal tears. *Retina.* 2005 Oct-Nov;25(7):897-901.
121. Soman N, Banerjee R. Artificial vitreous replacements. *Biomed Mater Eng.* 2003;13(1):59-74.

ANEXOS

Anexo 1 - Formulário de acompanhamento pós-operatório apresentado como no original aprovado no Comitê Animal Care da Universidade Columbia.

Follow-up form

Rabbit # _____ Eye _____ Weight _____ Date _____

Procedure:

- ERG recording ___ Pre-surgery ___ Post-surgery
- Post surgery F/U
 - 1 day post op. _____
 - 1 week post op. _____
 - Other _____
- Surgery
 - Intravitreal injection of C3F8 100% _____
 - Gas-PFPD exchange _____
 - Gas- Perfluorohexyloctane exchange _____
 - Gas-BSS exchange _____
 - Fluid removal _____
 - Paracentesis _____

Anesthesia:

- I.M Ketamine _____
- I.M Xylazine _____
- Proparacaine (topical) _____
- Status: _____

Pre-surgical medications:

- Gentamicin sulfate 0.3% (topical)

Post-surgical medication:

- Gentamicin sulfate 0.3% (topical)
- Bacitacin 500 U/gm (topical)

Anexo 2 – Documentação de Isenção de Conflitos de Interesse

DECLARAÇÃO DE ISENÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE

Eu, Rodrigo Almeida Vieira Santos, autor da tese intitulada “**ÉTER DECAFLUORO-DI-N-PENTIL: UMA NOVA OPÇÃO EXPERIMENTAL DE AGENTE TAMPONANTE INTRA-VÍTREO**”, declaro que dentro dos últimos 5 anos e para o futuro próximo não possuo conflito de interesse de ordem pessoal, comercial, política e financeira no substituto vítreo DFPE utilizado no desenvolvimento da tese.

Declaro também que todo o material utilizado durante o desenvolvimento da pesquisa e elaboração da tese teve seus custos pagos pelo próprio autor do estudo.

Brasília, 01 de julho de 2012.

Rodrigo Almeida Vieira Santos