

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA NA AVALIAÇÃO DE CAVIDADES ORBITÁRIAS PREENCHIDAS POR MEMBRANA AMNIÓTICA E HIDROXIAPATITA

Mariana Beligoli Gomes da Costa², Kelly Cristine de Sousa Pontes³,
Laércio Santos Benjamim⁴, Andrea Pacheco Batista Borges⁴, Cintia da
Cunha Abreu⁵, João Paulo Machado³

Resumo: *Em cães e gatos, as cirurgias de enucleação e evisceração, embora sem complicações frequentes, muitas vezes leva a uma órbita côncava, de aspecto desagradável e desfigurante. Para reduzir esse efeito, podem ser utilizados implantes intraorbitários visando manter o volume do bulbo ocular. O presente trabalho teve como objetivo avaliar qual biomaterial fornecia melhor integração com tecidos adjacentes, para assim manter o volume do bulbo. Para tanto, foram avaliados, histologicamente e por microscopia eletrônica de varredura (MEV), 09 bulbos oculares preenchidos com implantes intraorbitários de membrana amniótica bovina, conservada em glicerina 99%, em temperatura ambiente e hidroxiapatita sintética. Os resultados demonstraram que a hidroxiapatita é o biomaterial que apresentou melhor integração tecidual, sendo assim visualizado através de histopatologia e MEV. Assim, conclui-se que a membrana amniótica não se mostrou eficaz como implante intraorbitário, diferente da hidroxiapatita, que se mostrou eficaz, sendo possível a integração do tecido com o implante, mantendo o volume do bulbo ocular.*

Palavras-chave: *Cirurgia oftálmica, implantes intraorbitários, membranas*

²Pesquisa de Iniciação Científica da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde – FACISA/UNIVIÇOSA.

² Graduanda em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde FACISA/UNIVIÇOSA; marianabeligoli@hotmail.com

³ Professores do curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde FACISA/UNIVIÇOSA; kellycpontes@yahoo.com.br; jp@univicoso.com.br

⁴ Professores do curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, UFV; laercio@ufv.com.br; andrea@ufv.br

⁵ Médica Veterinária formada pela Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde FACISA/UNIVIÇOSA; cintiac.abreu@hotmail.com

biológicas, oftalmologia, olho.

Abstract: *In dogs and cats, the surgeries of enucleation and evisceration, though without frequent complications, very often it leads to a concave orbit, of unpleasant and disfiguring aspect. To reduce this effects, intraorbital implants can be used to maintain the volume of the ocular bulb. This study aimed to evaluate which biomaterial was supplying better integration with adjacent tissues, so to maintain the volume of the bulb. For so much, they were evaluated, histologically and by scanning electron microscopy (MEV), 09 ocular bulbs filled out with intraorbital implant bovine amniotic membrane preserved in glycerin 99% at room temperature and synthetic hydroxyapatite. The results showed that the hydroxyapatite is the biomaterial that showed better tissue integration, being visualized by histopathology and MEV. Thus, it is concluded that amniotic membrane was not as efficient as intraorbital implant, different from hydroxyapatite was shown effective, it being possible tissue integration with the implant, maintaining the volume of the ocular bulb.*

Keywords: *Biological membranes, eye, intraorbital implants, ophthalmic surgery, ophthalmology*

Introdução

Em cães e gatos, as cirurgias de enucleação e evisceração, embora sem complicações frequentes, muitas vezes leva a uma órbita côncava, de aspecto desagradável e desfigurante. Para reduzir esse efeito, podem ser utilizadas inclusões esféricas na cavidade anoftálmica, como a de hidroxiapatita (NASISSE, 1988; LEÃO, 2010). A utilização desses implantes é uma forma de preparar a cavidade para o recebimento de futura prótese externa, melhorando esteticamente a enoftamia causada pela atrofia dos tecidos perioculares que ocorre no período pós-operatório (LEÃO et al., 2010).

A hidroxiapatita (HA) é um sal de fosfato de cálcio, que se encontra de forma natural como parte mineral do osso humano, obtido de um coral marinho do gênero *Porites*. A HA sintética é bastante parecida tanto na do

osso natural em sua composição química ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), quanto no comportamento in vivo, o que constitui uma grande vantagem no seu uso. A HA é produzida sinteticamente desde o início dos anos 70 e tem sido utilizada clinicamente desde o início dos anos 80. Já era utilizada como substituta de enxertos ósseos em odontologia e ortopedia, pois apresenta um sistema de poros interconectados que, quando implantado em contato com ossos normais, possibilita novo crescimento ósseo dentro dos canais e, se colocada em tecidos moles, permite o crescimento de tecido fibrovascular em suas cavidades, sem desenvolver reação de corpo estranho ou promover encapsulamento, sendo que os canais formados são naturalmente interligados (MIYASHITA et al., 2012).

A membrana amniótica é composta por uma camada de epitélio cúbico simples e uma membrana basal espessa, formada basicamente de colágeno tipo IV, laminina e uma matriz estromal avascular, apresentando ação cicatricial, anti- inflamatória e antimicrobiana (SHIMAZAKI et al., 1997).

Utilizando-se a histopatologia e a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), é possível avaliar esses biomateriais quanto à integração tecidual e aos tipos celulares presentes no tecido. A MEV permite a observação e a caracterização de diferentes tipos de materiais, a partir da emissão e interação de feixes de elétrons sobre uma amostra, sendo possível caracterizá-los do ponto de vista de sua morfologia e sua organização ultraestrutural. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) a hidroxiapatita e a membrana amniótica bovina, conservada em glicerina 99%, em temperatura ambiente, como biomaterial para implantes intraorbitários de cavidades anoftálmicas.

Material e Métodos

Nove coelhas da raça Nova Zelândia Branca, fêmeas, adultas, foram avaliadas pelo exame clínico e oftálmico, submetidas à anestesia geral, e tiveram seu olho esquerdo eviscerado. A amostra foi dividida em três grupos: um composto por três olhos eviscerados, preenchidos com hidroxiapatita sintética (GH); outro também composto por três olhos eviscerados, que recebeu como material de preenchimento da esclera a membrana amniótica

bovina (GMA), conservada em glicerina 99%, em temperatura ambiente; além do grupo controle (GC), composto por três olhos, que não recebeu nenhum biomaterial como tratamento.

Os grupos foram subdivididos, sendo um olho do GH, um do GMA e um do GC, sendo os olhos enucleados aos sete, 60 e 100 dias de pós-operatório. Para histologia, foram analisados três olhos do GH, três olhos do GM e três olhos do GC, sendo um olho de cada período de pós-operatório. Para avaliação através da MEV, foram analisados nove olhos, sendo um de cada grupo em cada tempo de pós-operatório.

Após a enucleação, os olhos operados foram fixados em solução de Bouin por 24 horas. Depois desse tempo, foram seccionados na área central da lesão, dividindo o bulbo ocular em dois hemisférios: um para análise histológica e outro para microscopia eletrônica de varredura. Em seguida, as amostras foram transferidas para o álcool 70%.

Para análise através da MEV, as amostras foram cortadas em fragmentos menores, retiradas do álcool 70% e transferidas para álcool 80% e 90%, durante 30 minutos em cada solução. Posteriormente foram transferidas para álcool 100% durante 20 minutos, sendo o processo repetido três vezes, objetivando-se a desidratação das amostras. Na sequência, elas foram transferidas para a câmara do equipamento Secador de Ponto Crítico (“Critical Point Dryer”) Cal-tec, CPD 030, para secagem ao ponto crítico do CO₂ (CPD critical point drying). As amostras para MEV foram montadas no suporte porta-amostras do microscópio (“stub”), metalizadas no Equipamento Modular Balzers Union FDU 010 composto de Metalizador (“Sputter coating attachment”) SCA 010 e avaliadas no Microscópio Eletrônico de Varredura Leo, 1430VP, acoplado a sonda de raio-X (EDS), sendo obtidas fotomicrografias para MEV.

Para avaliação histológica, as amostras foram lavadas com solução salina 0,9% e imediatamente imersas em solução fixadora de formol tamponado a 10%, permanecendo por 48 horas até o momento da inclusão do fragmento em parafina. As lâminas foram preparadas, passando por soluções de xilol, álcool 100%, 90% e 80% e diafinizadas de forma rotineira, sendo utilizada coloração com eosina e hematoxilina. As lâminas foram analisadas com microscópio de epifluorescência acoplado à câmera digital e, assim, obtidas fotomicrografias para histologia.

Resultados e Discussão

Na avaliação histopatológica e na avaliação ultra-estrutural (MEV), aos sete dias de pós-operatório (PO), observou-se infiltrado inflamatório intenso nas escleras do GMA que, junto à fibroplasia, perdurou durante os períodos subsequentes. Na avaliação histopatológica nos olhos do GH, verificou-se presença menos intensa de células inflamatórias e exsudação fibrinosa nos poros do implante de hidroxiapatita comparado ao GMA. Na avaliação com MEV, foi observada a presença de densa trama fibroblástica que compõe a esclera e presença menos intensa de inflamação, com preenchimento dos poros existentes na hidroxiapatita comparadas ao GMA. No GC, comparando-se aos outros grupos, houve discreta resposta inflamatória, tanto na avaliação histopatológica quanto na MEV.

Aos 60 dias, o GC apresentou atrofia, visualizada principalmente pela microscopia eletrônica de varredura, e discreta necrose da esclera, além da ocupação do espaço eviscerado por tecido conjuntivo frouxo, exsudação fibrinosa e fibroplasia, visualizadas pela histopatologia. No GMA, no mesmo período, a MEV revelou proliferação de colágeno próximo à esclera e pouca fibroplasia. Ainda pela histopatologia, observou-se resposta inflamatória intensa com presença de células gigantes e intenso infiltrado polimorfonuclear, principalmente ao redor da esclera e ao redor do implante, caracterizando reação do tipo corpo estranho. No GH, pela histopatologia, houve maior integração do implante, resultando no crescimento de um tecido com matriz extracelular acidófila, contendo células mesenquimais no interior dos poros do implante. Foi encontrada, ainda no GH pela histopatologia, quantidade significativa de macrófagos, apresentando-se carregados de material refringente compatível com o implante fagocitado na região da esclera. Através da MEV, no mesmo período de 60 dias, observou-se resposta inflamatória na periferia da esclera e presença de fibroplasia.

A avaliação histológica dos animais do GH aos 100 dias de PO revelou resposta inflamatória discreta e processo de integração do tecido com o implante bastante avançado, com crescimento de tecido conjuntivo repleto de células mesenquimais no interior dos poros e formação de novos vasos. Na

avaliação ultra-estrutural (MEV), notou-se diminuição da reação inflamatória e presença de algumas hemáceas permeando o tecido fibrovascular. No GC, por histopatologia e MEV, observou-se que o espaço eviscerado havia sido totalmente preenchido por tecido conjuntivo frouxo e pela esclera, que sofreu retração. Na periferia da esclera, houve o desenvolvimento de tecido linfóide formando folículos. Ainda aos 100 dias no GMA, pela MEV, revelou-se intensa fibroplasia ao redor da esclera, além de degeneração da membrana amniótica, e pela histopatologia, notou-se presença de intenso infiltrado mononuclear, que caracterizou tecido de granulação, além de angiogênese.

Por meio da colocação de um implante na cavidade anoftálmica, procura-se alcançar boa aparência, boa mobilidade da prótese e o mínimo de complicações (SCHELLINI *et al.*, 1999). Isso não foi possível conseguir no grupo tratado com a membrana amniótica, devido à intensa resposta inflamatória que ela causou, caracterizando reação do tipo corpo estranho. No grupo controle, houve presença de fibrina e menor resposta inflamatória ao se comparar aos outros grupos, porém a ausência de tratamento não foi eficiente no que tange a estética por não manter o volume do bulbo. (NASISSE *et al.*, 1988).

Não houve incorporação do implante com os tecidos adjacentes no grupo tratado com membrana amniótica, diferente do grupo que recebeu a hidroxiapatita. Nesta, houve conexão dos tecidos adjacentes com o implante, notado pelo crescimento de tecido conjuntivo repleto de células mesenquimais no interior dos poros e pela formação de novos vasos. Sendo assim, a hidroxiapatita mostrou-se superior à membrana amniótica para ser utilizada como implante, pois, segundo Sclafani (1997), o implante deve se incorporar aos tecidos vizinhos (SCLAFANI *et al.*, 1997).

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos e a maneira como esta pesquisa foi realizada, conclui-se que a membrana amniótica não se mostrou eficiente como implante intraorbitário, diferente da hidroxiapatita, que se mostrou eficaz, sendo possível a integração do tecido com o implante, mantendo o volume do bulbo ocular.

Referências Bibliográficas

LEÃO, M.R., et al. Análise dos casos de perda do globo ocular no hospital regional de presidente prudente no período de 2008 a 2010. **Oftalmologia USP**, Presidente Prudente, p. 5-14, 2010. Disponível em < <http://oftalmologiausp.com.br/ePoster/PDF/i24.pdf>> MIYASHITA, D. Esferas de polimetilmetacrilato multiperfuradas como modelo de implante orbitário integrável - estudo experimental. 2012. 115f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Disponível em http://roo.fmrp.usp.br/teses/2012/denise_miyashita.pdf

NASISSE, M.P., EE, R.T. VAN, MUNGER, R.J. et al. Use o methyl methacrylate orbital prostheses in dogs and cats: 78 cases (1980-1986). **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 4, p. 539-542, 1988.

SCHELLINI, S.A., HOYAMA, E., PADOVANI, C.R., FERREIRA, V.L.R., ROSSA, R. Complicações com o uso de esferas não integráveis e integráveis na reconstrução da cavidade anoftálmica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 62, p. 382, 1999.

SCLAFANI, A.P., ROMO, T., SILVER, L. Clinical and histologic behavior of exposed porous high density polyethylene implants. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 99, p. 41-50, 1997. SHIMAZAKI, J., YANG, H.Y, TSUBOTA, K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. **Ophthalmology**, v. 104, p. 2068-76, 1997.