

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**  
**Departamento de Oftalmologia**

**Leonardo Bruno de Oliveira**

**Dispase associada à vitrectomia mecânica na indução do  
descolamento do vítreo posterior em suínos**

**Ribeirão Preto – USP**

**2005**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**LEONARDO BRUNO DE OLIVEIRA**

**Dispase associada à vitrectomia mecânica na indução do  
descolamento do vítreo posterior em suínos**

Tese apresentada ao Curso de Medicina da  
Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão  
Preto, como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor.

Área de concentração: Oftalmologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Jorge

**Ribeirão Preto – USP  
2005**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Oliveira, Leonardo Bruno

Dispase associada à vitrectomia mecânica na indução do descolamento do vítreo posterior em suínos.

Ribeirão Preto, 2005.

95p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Programa: Oftalmologia – Depto. de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Orientador: Jorge, Rodrigo

1. vitrectomia farmacológica, 2. descolamento posterior do vítreo, 3. dispase, 4. suíno

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Leonardo Bruno de Oliveira

Dispase associada à vitrectomia mecânica na indução do  
descolamento do vítreo posterior em suínos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto  
para obtenção do título de Doutor.  
Área de Concentração: Oftalmologia

Arprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## Agradecimentos

A Deus, por tudo.

Ao meu amigo e orientador Professor Rodrigo Jorge, e aos Professores Augusto Velasco, Brooks McCuen II e Fulton Wong pelo contínuo e imprescindível apoio ao meu trabalho.

Aos meus pais, Natal e Simonetti pela oportunidade que concederam na realização de minha tese.

À minha avó materna Lia por acreditar nos meus sonhos e ideais.

*E especialmente à minha esposa Ana Cristina pela cumplicidade, apoio e amor,  
sem os quais, a materialização desses sonhos não seria possível.*

## Resumo

OLIVEIRA, L.B de. **Dispase associada à vitrectomia mecânica na indução do descolamento do vítreo posterior em suínos.** 2005. 95 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto, 2005.

**Objetivo:** Avaliar o papel da dispase intravítrea associada à vitrectomia via pars plana na indução do descolamento de vítreo posterior em suínos.

**Métodos:** Vinte e quatro olhos de 24 animais foram randomizados para injeção intravítrea de dispase (50µg/0,05mL) ou solução salina balanceada (Grupo controle) imediatamente após a vitrectomia e antes da tentativa de indução do descolamento do vítreo cortical. Após um período de espera de 15 minutos, empregou-se a aspiração ativa subjacentemente ao nervo óptico, na tentativa mecânica de separação do vítreo posterior. No pós-operatório de 1<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas, os animais foram avaliados clinicamente, e examinados com eletroretinograma (4<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas), seguidos de enucleação para análise com microscopia de luz, eletrônica de transmissão e varredura.

**Resultados:** Baseado nos achados intra-operatórios e análise pós-operatória com microscopia eletrônica de varredura, os olhos que receberam injeção intravítrea de dispase apresentaram maior incidência de descolamento do vítreo posterior comparados com os olhos que receberam injeção intravítrea de solução salina balanceada (p= 0,029). As respostas eletroretinográficas obtidas na 4<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de pós-operatório foram semelhantes entre os grupos dispase e solução salina quando comparados com os olhos controles contralaterais de ambos os grupos. Exames clínicos, incluindo oftalmoscopia indireta, foram semelhantes no grupo controle, e em 11 de 12 animais do grupo dispase. A microscopia de luz, eletrônica de transmissão e varredura não demonstraram diferenças significativas entre os olhos tratados com dispase ou com solução salina balanceada.

**Conclusão:** Dispase mostrou-se útil como adjuvante à vitrectomia via pars plana facilitando a indução cirúrgica do deslocamento do vítreo posterior em suínos.

**Palavras-chaves:** Vitrectomia farmacológica; Descolamento posterior do vítreo; Dispase; Suíno

## Abstract

OLIVEIRA, L.B. de. **Dispase assisted vitrectomy to induce posterior vitreous detachment in pigs.** 2005. 95 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto, 2005.

**Purpose:** To evaluate the role of intravitreal dispase in conjunction with pars plana vitrectomy to facilitate the creation of a posterior vitreous detachment in young pig eyes.

**Methods:** Twenty-four eyes of 24 animals were randomized to receive an intravitreal injection of dispase (50µg/0.05ml) or phosphate buffered saline (PBS) immediately after core vitrectomy and prior to attempted creation of a posterior cortical vitreous detachment. Following a 15-minute waiting period, surgical creation of a posterior vitreous separation was attempted by aspiration of the posterior vitreous immediately adjacent to the optic disc. Eyes were evaluated postoperatively by clinical examination (1, 4 and 8 weeks) and electroretinography (4 and 8 weeks) following which they were enucleated for light, scanning and transmission electron microscopy.

**Results:** Based on intraoperative findings and postoperative scanning electron microscopy, eyes receiving intravitreal dispase exhibited a higher incidence of posterior vitreous detachment compared to eyes receiving PBS ( $P= 0.029$ ). Electroretinographic responses recorded at postoperative weeks 4 and 8 were similar in both dispase and PBS eyes compared to the unoperated fellow eye. Clinical examinations, including indirect ophthalmoscopy, were indistinguishable between the PBS eyes and 11 of 12 eyes in the dispase group. Light, scanning and transmission electron microscopy demonstrated no differences in the retina between the dispase eyes and the PBS operated controls.

**Conclusion:** Dispase is a useful adjunct in facilitating surgical creation of a posterior vitreous detachment in young pig eyes.

**Keywords:** Pharmacological vitreolysis; Posterior vitreous detachment; Dispase; Swine.

## Lista de Figuras

Figura 1.	Hialócitos humanos. Microscopia de luz de córtex vítreo de uma criança de 11 anos de idade. Microscopia eletrônica de transmissão da estrutura celular de hialócito humano envolvido em fibras colágenas do córtex vítreo. Apresenta estrutura nuclear lobulada. No citoplasma, apresenta mitocôndria, grânulos densos, vacúolos e microvilos .....	18
Figura 2.	Diagrama esquemático da anatomia do vítreo .....	19
Figura 3.	Diagrama esquemático tridimensional de interação das fibras colágenas e ácido hialurônico .....	24
Figura 4.	Corpo vítreo obtido de autópsia de uma criança de 9 meses de idade. A coróide e esclera foram dissecadas, sendo que, em suas partes anteriores permaneceram aderidas ao corpo vítreo. A porção anterior da retina se encontra aderida ao gel vítreo devido à forte aderência da base vítrea. Devido à idade do doador, observa-se a integridade anatômica do vítreo .	26
Figura 5.	Análise morfológica em biomicroscopia de campo escuro de córtex vítreo humano em pólo posterior .....	27
Figura 6.	Liquefação do vítreo humano. O vítreo humano de diferentes idades, em estado gel e líquido, foi coletado e o volume aferido após o óbito em diferentes idades. A presença do vítreo líquido é evidenciada, aproximadamente, aos 5 anos de idade, atingindo mais de 50% do volume total por volta da sétima década. O volume de vítreo gel aumenta durante a primeira década devido ao crescimento ocular, iniciando sua regressão na quarta década paralelamente ao aumento do vítreo líquido .....	34
Figura 7.	Biomicroscopia em campo escuro do corpo vítreo na terceira idade. As fibras colágenas centrais espessam-se, tornando-se tortuosas, enquanto a periferia do vítreo apresenta regiões que contêm vítreo líquido correspondente a lacunas .....	37
Figura 8.	Vitreosquise, evidenciada ao ultrassom B-scan e A-scan. Parede externa do córtex e parede interna do córtex .....	40

Figura 9.	Microscopia eletrônica de varredura da superfície interna de retina de suíno submetido à vitrectomia. Em região peripapilar inferior, nota-se rasgadura de retina provocada por tração vítreo-retiniana durante indução mecânica do descolamento do vítreo posterior. Subjacente à rotura, nota-se persistência de colágeno do vítreo cortical .....	49
Figura 10.	Corte coronal de globo ocular enucleado fixado em glutaraldeído 2%, de suíno <i>Sus scrofa</i> . Estrutura ocular de dimensões semelhantes ao olho humano .....	51
Figura 11.	Suínos da espécie <i>Sus scrofa</i> de 7 semanas .....	54
Figura 12.	Ilustração da realização da oftalmoscopia indireta .....	55
Figura 13.	Ilustração do campo cirúrgico durante a realização da vitrectomia via pars plana .....	56
Figura 14.	Descolamento total do vítreo posterior após injeção de dispase e vitrectomia em suíno. Identificação de linha contínua e de forma crescente na superfície retiniana que se move anteriormente a partir da papila do nervo óptico em direção à periferia, correspondente à separação da hialóide posterior. Retinografia evidenciando o descolamento da hialóide posterior mediante a presença do anel de Weiss em porção média da cavidade vítrea, sendo este confirmado com ultrassonografia pós-operatória .....	58
Figura 15.	Ilustração da realização do eletroretinograma após o tratamento cirúrgico .	60
Figura 16.	Retinografia de suíno na quarta semana pós-operatória. Apresenta estruturas oculares preservadas, meio totalmente transparente e sem evidência de efeitos colaterais intra-oculares .....	65
Figura 17.	Exemplificação de resposta eletroretinográfica de suíno. Respostas escotópicas em dois diferentes animais e respostas fotópicas entre os olhos operado e controle do mesmo animal, comparativamente simétricos na 8ª semana pós-operatória .....	68

Figura 18.	Comparação da média e desvio-padrão do grupo dispase da análise eletroretinográfica para a resposta escotópica e resposta fotópica de 1Hz e 29Hz, segundo o tempo implícito, no grupo de olho operado e olho contralateral .....	69
Figura 19.	Comparação da média e desvio-padrão do grupo dispase da análise eletroretinográfica para a resposta escotópica e resposta fotópica, segundo a amplitude da onda B, de 1Hz e 29Hz no olho operado e olho contralateral	70
Figura 20.	Comparação da média e desvio-padrão do grupo controle da análise eletroretinográfica para a resposta escotópica e resposta fotópica de 1Hz e 29Hz, segundo o tempo implícito no olho operado e olho contralateral .....	71
Figura 21.	Comparação da média e desvio-padrão do grupo controle da análise eletroretinográfica para a resposta escotópica e resposta fotópica de 1Hz e 29Hz, segundo a amplitude da onda B, no olho operado e olho contralateral .....	72
Figura 22.	Microscopia de luz de retina de suíno mostrando a morfologia de retina neurosensorial e interface vítreo-retiniana. Pós-operatório de vitrectomia, na qual se pode observar a presença de fina camada de colágeno correspondente à presença de hialóide posterior aderida à superfície retiniana. Notam-se encolhimento de células ganglionares correspondentes a artefatos de técnica inerentes à fixação tecidual .....	73
Figura 23.	Microscopia eletrônica de varredura de superfície interna de retina de suíno, evidenciando completo descolamento do vítreo posterior durante a vitrectomia associada com injeção de dispase. A superfície da retina apresenta-se completamente desprovida de colágeno sobrejacente, podendo evidenciar superfície lisa e ondulada correspondente à membrana limitante interna sobre os pedículos da célula de Muller. Microscopia eletrônica de varredura também de superfície interna retiniana evidenciando descolamento parcial do vítreo posterior em olho submetido à vitrectomia. Nota-se a presença de estrutura hialóide do vítreo posterior aderida à superfície retiniana e superfície adjacente correspondente à exposição da MLI. Região onde o córtex vítreo permaneceu totalmente colado à superfície interna da retina após vitrectomia associado à dispase .....	75

- Figura 24. Microscopia eletrônica de transmissão de superfície vítreo-retiniana de suíno após indução de descolamento do vítreo posterior durante vitrectomia associado à dispase. Nota-se membrana limitante interna com anatomia preservada e aplicada à superfície retiniana. Não há remanescente de fibras colágenas aderidas à retina. Microscopia eletrônica de transmissão de superfície vítreo-retiniana de suíno após vitrectomia associado com injeção salina. Observa-se segmento onde fibrilas colágenas permanecem aderidas à membrana limitante interna da retina ..... 76
- Figura 25. Microscopia de luz, retina de suíno após 24 horas, 500µg de dispase intravítreo. Notam-se focos hemorrágicos em diversas camadas de retina neurosensorial, descontinuidade de membrana limitante interna e contração tecidual envolvendo toda a espessura de retina ..... 78
- Figura 26. Microscopia eletrônica de varredura de superfície interna de retina de suíno submetido à vitrectomia associando dispase na indução do vítreo posterior. Notam-se áreas correspondentes ao descolamento do vítreo, superfície interna da retina ondulada sem evidência de fibrilas colágenas subjacentes, assumindo superfície de padrão ondulado com tênues e múltiplas protuberâncias correspondentes aos pedículos das células de Muller cobertos por membrana limitante interna intacta ..... 82
- Figura 27. Microscopia eletrônica de transmissão de superfície vítreo-retiniana de suíno após indução de descolamento do vítreo posterior durante vitrectomia associado à dispase e grupo controle. Nota-se em porção interna de retina a presença de formações vacuolares, nos dois grupos, secundários ao processo de fixação tecidual ..... 83
- Figura 28. Microscopia eletrônica de varredura de superfície interna de retina de suíno submetido à injeção intravítrea dispase na tentativa de indução do vítreo posterior. Notam-se múltiplas estruturas arredondadas e protuberantes correspondentes à exposição de pedículos das células de Muller sem evidência de fibrilas colágenas vítreas subjacentes, no entanto, evidenciando aspecto de importante desestruturação de membrana limitante interna subjacente, secundário à prolongada exposição enzimática ..... 84

- Figura 29. Microscopia eletrônica de varredura de interface vítreo-retiniana de um jovem de 14 anos. Durante a preparação do tecido, complexo esclera-córóide e retina foram dissecados do corpo vítreo. Notam-se múltiplas estruturas arredondadas e protuberantes correspondentes aos pedículos das células de Muller que se encontravam fortemente aderidas ao vítreo, evidenciando sua exposição devido à desestruturação de membrana limitante interna subjacente ..... 85
- Figura 30. Microscopia eletrônica de varredura de superfície interna de retina de suíno submetido à vitrectomia associado à dispase na indução do vítreo posterior. Notam-se áreas correspondentes ao descolamento do vítreo, superfície interna da retina ondulada, sem evidência de fibrilas colágenas subjacentes, assumindo superfície de padrão ondulado com tênues e múltiplas protuberâncias correspondentes aos pedículos das células de Muller cobertos por membrana limitante interna intacta ..... 86

## Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Grupo dispase, seguimento pós-operatório .....	59
Tabela 2 -	Grupo controle, seguimento pós-operatório .....	59
Tabela 3 -	Classificação do descolamento do vítreo posterior dos grupos dispase e controle com e sem o auxílio da microscopia eletrônica de varredura .....	64
Tabela 4 -	Resultado da análise segundo o grau de opacidade feita nos animais durante a 1ª, 4ª e 8ª semana de pós-operatório no grupo dispase .....	66
Tabela 5 -	Resultado da análise segundo o grau de opacidade feita nos animais durante a 1ª, 4ª e 8ª semana de pós-operatório no grupo controle .....	67
Tabela 6 -	Resultados individuais de 8 animais, média e desvio-padrão da análise eletroretinográfica, segundo o tempo implícito para resposta escotópica, e fotópica de 1Hz e 29Hz no grupo dispase olho operado e olho contralateral .....	69
Tabela 7 -	Resultados individuais de 8 animais, média e desvio-padrão da análise eletroretinográfica segundo a amplitude da onda B, para resposta escotópica e fotópica de 1Hz e 29Hz no grupo dispase olho operado e olho contralateral .....	70
Tabela 8 -	Resultados individuais de 3 animais, média e desvio-padrão da análise eletroretinográfica segundo o tempo implícito, para resposta escotópica e fotópica de 1Hz e 29Hz no grupo controle, olho operado e olho contralateral .....	71
Tabela 9 -	Resultados individuais de 3 animais, média e desvio-padrão da análise eletroretinográfica segundo a amplitude da onda B, para resposta escotópica e fotópica de 1Hz e 29Hz no grupo controle, olho operado e olho contralateral .....	72
Tabela 10 -	Achados clínicos para determinação do descolamento do vítreo posterior, bem como resultados complementares para análise dos resultados do grupo dispase .....	73
Tabela 11 -	Achados clínicos para determinação do descolamento do vítreo posterior, bem como resultados complementares para análise dos resultados do grupo controle .....	76

## Lista de Abreviaturas e Siglas

%	- Porcentagem
DVP	- Descolamento do vítreo posterior
EPR	- Epitélio pigmentar retiniano
ERG	- Eletroretinograma
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
Hz	- Hertz
IM	- Intramuscular
µm	- Micrômetro
M	- Molar
MEC	- Matriz extra-celular
µg	- Micrograma
mg	- Miligrama
mL	- Mililitro
MLI	- Membrana limitante interna
mm	- Milímetro
nm	- Nanômetro
°C	- Graus Celsius
PBS	- <i>Phosphate buffered saline</i> – Solução salina tamponada com fosfatos
UI	- Unidades internacionais

## SUMÁRIO

Resumo .....	4
Abstract .....	5
<b>1 Revisão de Literatura .....</b>	<b>15</b>
1.1 Embriologia do vítreo .....	15
1.1.1 Embriogênese estrutural .....	15
1.1.1.1 Vítreo primário .....	15
1.1.1.2 Vítreo secundário .....	16
1.1.1.3 Vítreo terciário (sistema zonular) .....	20
1.1.2 Embriogênese molecular .....	20
1.1.2.1 Colágeno .....	20
1.1.2.2 Glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas .....	21
1.2 Bioquímica do vítreo .....	21
1.2.1 Colágeno .....	21
1.2.2 Ácido hialurônico .....	22
1.2.3 Interação ácido hialurônico-colágeno .....	23
1.2.4 Substâncias de baixo peso molecular .....	25
1.3 Estrutura do vítreo .....	25
1.3.1 Base vítrea .....	25
1.3.2 Córtex vítreo .....	26
1.3.3 Membrana basal e interface vítreo-retiniana .....	28
1.4 Funções do vítreo .....	30
1.5 Evolução e maturação do vítreo .....	32
1.6 Reologia do vítreo .....	33
1.7 Alterações morfológicas relacionadas à idade .....	36
1.7.1 Membrana limitante interna .....	36
1.7.2 Base vítrea .....	36
1.7.3 Corpo vítreo .....	36
1.8 Descolamento do vítreo posterior .....	37

1.9	Descolamento anômalo do vítreo posterior .....	39
1.9.1	Ruptura do tecido retiniano .....	39
1.9.2	Ruptura longitudinal do córtex vítreo (vitreosquise) .....	40
1.10	Vitrectomia farmacológica .....	41
1.10.1	Hialuronidase .....	43
1.10.2	Plasmina .....	44
1.10.3	Dispase .....	45
1.10.4	Condroitinase .....	46
1.10.5	RGD peptide .....	46
<b>2</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>Material e Método .....</b>	<b>53</b>
4.1	Preparação da dispase .....	53
4.2	Animais .....	53
4.3	Procedimento .....	54
4.4	Classificação do deslocamento vítreo posterior .....	57
4.5	Avaliação pós-operatória .....	58
4.6	Eletrofisiologia .....	60
4.7	Avaliação clínica .....	61
4.8	Exame histológico .....	61
4.9	Análise estatística .....	62
<b>5</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>88</b>

# **1 REVISÃO DE LITERATURA**

## **1.1 Embriologia do vítreo**

Para melhor compreensão da origem e funções da estrutura do corpo vítreo e seu papel nos diferentes aspectos fisiopatológicos, dividiremos a abordagem embriológica em:

- Embriogênese estrutural.
- Embriogênese molecular.

### **1.1.1 Embriogênese estrutural**

#### **1.1.1.1 Vítreo primário**

Durante a terceira e quarta semana de gestação, quando o ectoderma neural separa-se de seu folheto superficial, são evidenciados os processos mais precoces da formação do vítreo (MANN, 1964). Uma estrutura fibrilar correspondente ao vítreo primário encontra-se em contato com a lâmina basal entre os dois tecidos ectodérmicos (presumivelmente trata-se de tecido colágeno), que, posteriormente, entra em contato com o tecido embrionário correspondente às células de Muller. Além disso, estão presentes estruturas interfibrilares, que acredita-se tratar de glicoproteínas e glicosaminoglicanas (BALAZS, 1984; SPENCER, 1985).

Subsequentemente a vesícula óptica adquire a conformação de uma concavidade, por onde células mesodermiais penetram a cavidade vítrea através da fissura fetal. Essas células são responsáveis pela formação da artéria hialóidea e da rede capilar conhecida como ‘vasa hialóidea própria’, que permeiam toda a cavidade vítrea (JACK, 1972a; BALAZS, 1975).

Por volta da quinta semana de gestação, a fissura óptica inicia o seu fechamento, por meio da fusão de sua porção anterior. Durante esse período, a estrutura ocular torna-se um sistema fechado em que se forma a pressão intraocular, e um aumento progressivo do vítreo, que determina o crescimento e desenvolvimento do globo ocular.

A continuidade entre o folheto ectodérmico superficial e neural persiste até a sexta semana, em que o próprio folheto superficial, terminando sua contribuição na formação do vítreo, é responsável pela formação do cristalino.

#### 1.1.1.2 Vítreo secundário

O desenvolvimento do vítreo secundário estende-se no período de 6 à 12 semanas gestacionais, localizando-se entre a retina e a porção posterior da vasa hialóidea própria.

O vítreo secundário consiste numa estrutura acelular essencialmente composta de matriz extra-celular (MEC), principalmente, colágeno do tipo II (SMITH; LINSENMAYER; NEWSOME, 1976; Von Der MARK et al., 1977). Na décima segunda semana de gestação, a junção entre o vítreo primário e secundário foi evidenciada como uma linha de demarcação em sua porção anterior, com extensões laterais entre a face anterior da artéria hialóidea e a face posterior do cristalino (BALAZS, 1975). O plano da linha de demarcação estende-se, posteriormente, e justaposto às paredes da artéria hialóidea central, formando uma estrutura em forma de funil. Portanto, esta junção central entre o vítreo primário e secundário torna-se o chamado 'canal de Cloquet', onde as estruturas vasculares sofrem regressão, e a face anterior origina o córtex do vítreo anterior justaposto ao cristalino. Concomitantemente, podem-se evidenciar fibras colágenas, que se estendem da área correspondente ao disco óptico, passando pelo equador e inserindo-se em porção posterior de tecido mesodermal (íris), formando uma alça (*loop*) anterior, que, mais tarde, no desenvolvimento da estrutura ocular, é identificado como parte da base vítrea adjacentes à ora serrata.

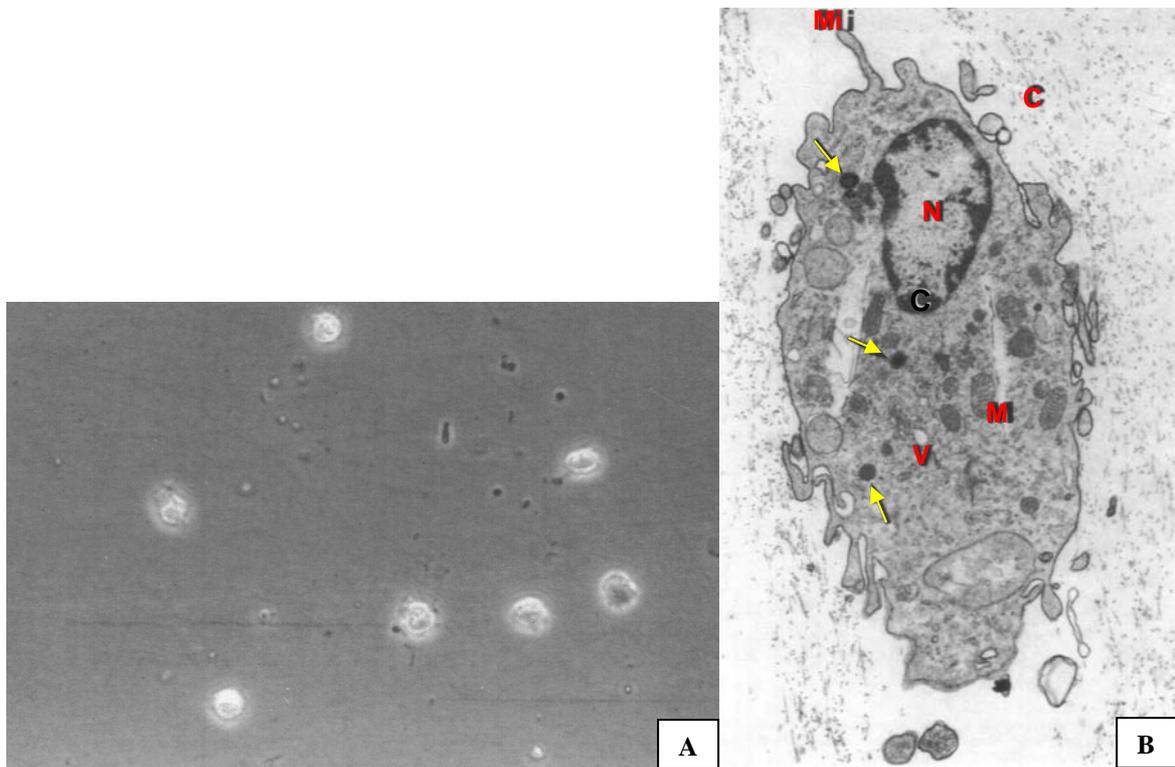
Por volta da 16<sup>a</sup> à 20<sup>a</sup> semana de gestação, forma-se a zônula, seguindo-se da localização de hialócitos maturados no córtex vítreo.

Acredita-se que os hialócitos são remanescentes do vítreo primário, e ao redor da 12<sup>a</sup> à 20<sup>a</sup> semana, originam e migram-se para o vítreo cortical. No entanto, com o crescimento do olho após o nascimento, a densidade das células diminui, pois elas não sofrem mitose (BALAZS et al., 1964; BLOOM; BALAZS, 1965). Balazs e Ozanics (1982) mostraram que os hialócitos estão localizados no vítreo cortical, geralmente à uma distância de 50µm da superfície interna da retina, principalmente na região de base vítrea e peripapilar. Posteriormente, num estudo experimental em coelhos, Haddad e André (1998), constataram maior concentração de hialócitos na câmara posterior do que na própria cavidade vítrea.

Quanto à função celular alguns autores sugerem que os hialócitos consistem-se em células secretórias de ácido hialurônico (JACOBSON, 1978) e colágeno (NEWSOME; LINSENMAYER; TRELSTAD, 1976). Tais achados, no entanto, não puderam ser reproduzidos. Bertazolli-Filho, Laicine e Haddad (1996) sugeriram que grande parte de componentes macromoleculares do vítreo foram relacionados à ação secretória da camada interna do epitélio ciliar.

O sistema hialóideo vascular atinge o seu pico de desenvolvimento na nona semana de gestação. Logo apresenta atrofia dos vasos, seguindo-se pela formação da ‘túnica vasculosa lentis’, e, finalmente, no sétimo mês de gestação, ocorre a interrupção do fluxo sanguíneo na artéria hialóidea (JACK, 1972b). A regressão dos vasos ocorre pela deposição de glicogênio e lipídios nas células endoteliais e pericitos (JACK, 1972b). Contudo, as células endoteliais, músculo liso da parede vascular e camada adventícia, sofrem um processo de necrose em que são fagocitados por monócitos (BALAZS, 1975). Portanto, acredita-se que os fatores anti-angiogênicos, envolvidos na involução da rede vascular hialóidea, são essenciais para

minimizar a dispersão dos raios luminosos e atingir a transparência de meio do corpo vítreo maduro (Figura 1).

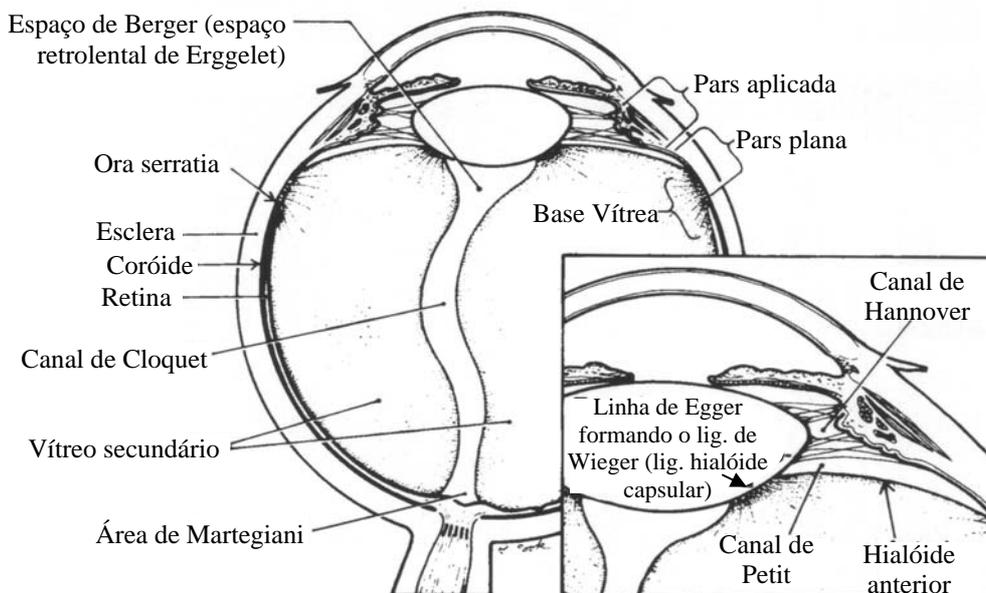


**Figura 1.** A. Hialócitos humanos. Microscopia de luz de córtex vítreo de uma criança de 11 anos de idade. B. Microscopia eletrônica de transmissão da estrutura celular de hialócito humano envolvido em fibras colágenas do córtex vítreo (C vermelho). Apresenta estrutura nuclear lobulada (N). No citoplasma, apresenta mitocôndria (M), grânulos densos (seta amarela), vacúolos (V) e microvilos (Mi) (Fonte: SEBAG; HAGEMAN, 2000, p. 48)

O sistema hialóideo vascular atinge o seu pico de desenvolvimento na nona semana de gestação. Logo apresenta atrofia dos vasos, seguindo-se pela formação da ‘túnica vasculosa lentis’, e, finalmente, no sétimo mês de gestação, ocorre a interrupção do fluxo sanguíneo na artéria hialóidea (JACK, 1972b). A regressão dos vasos ocorre pela deposição de glicogênio e

lipídios nas células endoteliais e pericitos (JACK, 1972b). Contudo, as células endoteliais, músculo liso da parede vascular e camada adventícia, sofrem um processo de necrose em que são fagocitados por monócitos (BALAZS, 1975). Portanto, acredita-se que os fatores anti-angiogênicos, envolvidos na involução da rede vascular hialóidea, são essenciais para minimizar a dispersão dos raios luminosos e atingir a transparência de meio do corpo vítreo maduro.

Os remanescentes estruturais da transição do vítreo primário para o secundário foram descritos por anatomistas do início do século, sendo que a maioria dessas estruturas leva seus nomes. Por exemplo, o canal de *Cloquet* trata-se de um espaço virtual previamente ocupado pela anastomose entre a artéria hialóidea e a túnica vasculosa lentis. Bem como os remanescentes da artéria hialóidea no disco óptico são conhecidos como papila de *Bergmeister*, ou o espaço retroental, também virtual, de *Berger* (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama esquemático da anatomia do vítreo (Fonte: SEBAG; HAGEMAN, 2000, p. 41)

### 1.1.1.3 Vítreo terciário (sistema zonular)

Historicamente conhecido como vítreo terciário, o sistema zonular, no entanto, não apresenta semelhança bioquímica ou estrutural com o vítreo.

Como mencionado anteriormente, a zônula cristalina desenvolve-se por volta da 16ª semana gestacional, pelo ectoderma superficial, que se acredita ser responsável pela síntese do tecido elástico zonular. O trajeto das fibras zonulares estendem-se do equador cristalino à pars plana, que se dividem em fibras orbículo-antero capsular e orbículo-postero capsular, formando entre elas o ‘canal de Hanover’. Outro espaço formado pelas fibras antero capsulares e o córtex vítreo anterior, com importância clínica durante injeções intravítreas de gases ou soluções, denomina-se ‘Canal de Petit’ (SEBAG; BALAZS, 1989) (ver Figura 2).

## 1.1.2 Embriogênese molecular

### 1.1.2.1 Colágeno

Existem diferentes teorias sobre a origem de produção do colágeno. Mann (1964) afirma que, potencialmente, os três tecidos embrionários sintetizam o colágeno vítreo: ectoderma superficial, neuroectoderma e mesoderma.

Balazs (1984) sugere que a maioria das fibrilas de colágeno são sintetizadas durante o desenvolvimento do vítreo neonatal na adventícia perivascular do sistema arterial hialoidal. O mesmo autor afirma não existirem evidências de que a cadeia de colágeno vítreo seja sintetizada ativamente durante o período adulto, desde que, após vitrectomia, não há regeneração de fibrilas colágenas. Portanto, aparentemente, a síntese de fibrilas de colágeno durante o período gestacional pode ser parcial ou totalmente inibida na vida adulta.

### 1.1.2.2 Glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas

Apesar de existirem evidências de ácido hialurônico (glicosaminoglicana) e sulfato de condroitina (proteoglicana) por volta da nona semana de gestação (AKIYA; UEMURA; SAGA, 1984), de acordo com Balazs (1984), a síntese de ácido hialurônico parece não se iniciar de maneira importante em períodos embrionários. Contudo, o mesmo autor afirma que a síntese de ácido hialurônico pode não ocorrer antes do nascimento, e que o pico máximo de sua concentração no vítreo não é atingido antes da idade adulta.

As proteínas não colágenas, glicoproteínas e proteoglicanas, são historicamente, os componentes do vítreo menos estudados. Balazs (1984) evidenciou altas concentrações, desde estágios iniciais da embriogênese com subsequente queda progressiva, até os estágios finais antes do nascimento. Logo após ao nascimento, sua concentração estabiliza-se, mantendo-se até a fase adulta. No entanto, Haddad et al. (1990a), em estudo experimental em coelhos albinos, detectaram provável secreção de glicoproteínas pelos tecidos intraoculares, após injeção intravítrea de [<sup>3</sup>H]fucose (substância com alta afinidade por glicoproteínas). Esses achados corroboraram com estudos de Maurice e Mishima (1984), que demonstraram através da injeção intravítrea de diferentes marcadores de glicoproteínas, existir um processo dinâmico de renovação dessas macromoléculas.

## 1.2 Bioquímica do vítreo

### 1.2.1 Colágeno

Trata-se da principal proteína estrutural do corpo vítreo, composta de três cadeias de polipeptídeos, conhecidos como cadeias alfa, que se organizam em configuração helicoidal.

Segundo Bishop (1996) foram descritos 18 tipos diferentes de colágenos. Existem entretanto, diferenças na composição química entre o colágeno presente no vítreo e em outras estruturas extra-oculares do tecido conectivo (SWANN; SOTMAN, 1980). Sabe-se que o colágeno vítreo contém uma quantidade maior de carboidratos (dissacarídeos) agregados às cadeias alfa, semelhante ao encontrado nas membranas basais.

Apesar de o colágeno tipo II tratar-se de, aproximadamente, 80% do colágeno presente no vítreo, foram evidenciados tipos híbridos dos tipos V/XI e do tipo IX (Von Der MARK, 1981; SEERY; DAVISON, 1990). Por se tratar de diferentes tipos de colágenos que constituem a estrutura vítrea, apresentam ligações cruzadas covalentes (*cross-links*), que interagem com a matriz extracelular circunjacente, essencial para a formação tridimensional e a adesividade do corpo vítreo (BISHOP, 1996).

### 1.2.2 Ácido hialurônico

Trata-se da mais importante das glicosaminoclicanas presente no vítreo, constituído de um polímero de cadeia longa em hélice dobrada sobre si mesma, composta por várias unidades de dissacarídeos (n-acetil glicosamina e ácido glicurônico) ligadas ao ácido urônico. Alguns autores defendem que sua síntese é realizada pelos hialócitos (apesar da existência de outras hipóteses de sua produção, como as células de Muller e o corpo ciliar), cuja concentração permanece estável durante a vida adulta, provavelmente, devido ao equilíbrio entre sua produção e a absorção pela câmara anterior (SWEENEY; BALAZS, 1964; LAURENT; FRASER, 1983).

Em decorrência de sua alta afinidade pela molécula de água é co-responsável (juntamente com a interação iônica adjacente) pelo volume do vítreo, sofrendo sua molécula alterações conformacionais, implicando-se diretamente na fisiopatogênese de doenças como a diabetes mellitus (SEBAG, 1996).

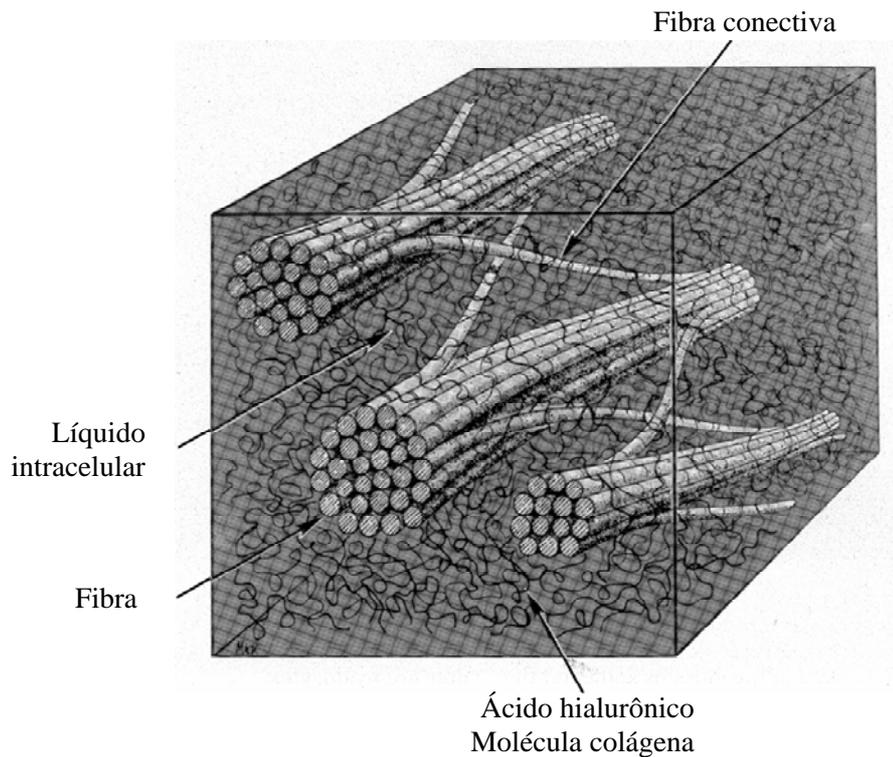
### 1.2.3 Interação ácido hialurônico-colágeno

O arcabouço vítreo consiste na interpenetração entre as fibrilas colágenas, responsáveis pela estrutura sólida do vítreo, e o ácido hialurônico pelo volume hídrico (propriedade osmótica). Ou seja, se removermos o colágeno, o residual torna-se uma solução viscosa, por outro lado, se removêssemos o ácido hialurônico, o corpo vítreo se encolheria devido à sua desidratação (COMPER; LAURENT, 1978).

Estudos da fisiologia do vítreo sugerem uma íntima relação entre as fibrilas colágenas e as proteoglicanas (moléculas resultantes da ligação entre as glicosaminoglicanas e proteínas), como por exemplo, o sulfato de condroitina e sulfato de keratan. Por meio de sítios considerados *não colágenos*, presentes nos diferentes tipos de fibrilas colágenas, forma-se a interação estrutural da matriz extracelular do corpo vítreo (BISHOP, 1996). Jackson (1953) foi o primeiro a propor que as proteoglicanas exercem um efeito estabilizador sobre o colágeno.

Acredita-se também, que a interação entre colágeno e ácido hialurônico é mediada por um terceiro componente, que exerce o papel de interconecção eletrostática - as glicoproteínas (MATHEWS, 1965; SWANN; CONSTABLE; CAULFIELD, 1975) (Figura 3). Em estudo experimental em coelhos albinos, Haddad et al. (1990b) demonstraram que as glicoproteínas intravítreas sofrem contínua renovação, provavelmente durante toda a sua vida, sendo estas secretadas continuamente na cavidade vítrea pela face interna do epitélio do corpo ciliar.

Sabe-se também que a albumina é a proteína de maior concentração no corpo vítreo, sendo esta provavelmente originada do plasma sangüíneo. No entanto, demonstrou-se que parte da transferrina vítrea (um tipo de glicoproteína) é produzida dentro da cavidade vítrea (HADDAD; LAICINE, 1993; LAICINE; HADDAD, 1994).



**Figura 3.** Diagrama esquemático tridimensional de interação das fibras colágenas e ácido hialurônico (Fonte: SEBAG, 1989, p.45)

Apesar da fisiologia molecular que envolve a adesividade das glicoproteínas aos diferentes componentes da matriz extracelular não ser completamente compreendida, sabe-se que a fibronectina (glicoproteína presente na interface vitreoretiniana) apresenta alta afinidade de ligação ao colágeno tipo II e ao ácido hialurônico (dois dos maiores componentes do corpo vítreo) (RUOSLAHTI; HAYMAN; ENGVALL, 1980). Posteriormente estudos postularam que a ligação entre os componentes da MEC e da própria MEC à receptores celulares (integrinas), dá-se por meio dos isótopos de ligação presentes nas diferentes macromoléculas (como por exemplo, Arg-Gly-Asp – seqüência RGD). Este fato reforça a importância do papel das glicoproteínas na estabilização da arquitetura vítrea e sua adesividade à superfície retiniana (RUOSLAHTI, 1991).

#### 1.2.4. Substâncias de baixo peso molecular

O vítreo é composto, predominantemente, por água e vários íons e moléculas (por exemplo, sódio, potássio, cálcio, fosfatos e bicarbonato), que concedem a propriedade de osmolaridade do gel e, conseqüentemente, são responsáveis pelo seu volume. Tais moléculas de baixo peso molecular, teoricamente, não sofrem restrição pela barreira vascular, no entanto, devido à complexa interação molecular, a osmolaridade do vítreo é pouco mais alta que a do sangue e o fluido cerebrospinal (288 à 323 mOsm/Kg) (STURNER et al., 1972).

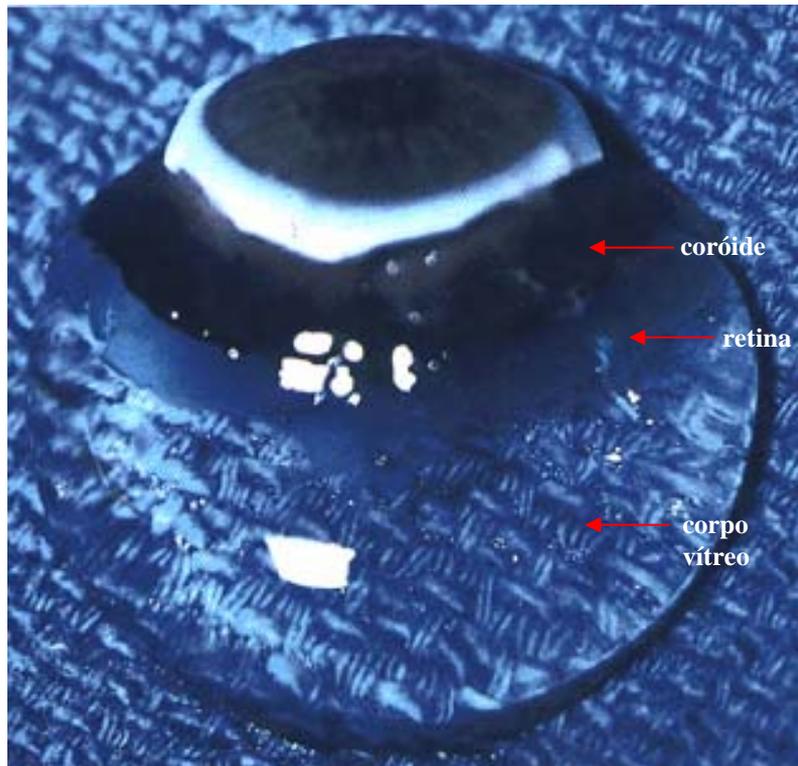
### 1.3 Estrutura do vítreo

#### 1.3.1 Base vítrea

A estrutura tridimensional da base vítrea estende-se de 1,5mm à 2mm anterior à ora serrata até 1mm à 3mm posterior à ora serrata, incorporando-se internamente ao corpo vítreo, sendo que, em sua porção temporal, estende-se mais posteriormente que em sua porção nasal (HOGAN, 1963). A borda posterior da base vítrea insere-se em superfície retiniana equatorial de maneira irregular (a inserção não se apresenta em padrão retilíneo), o que corresponde anatomicamente à localização na formação de roturas retinianas periféricas. Por sua vez, as fibrilas mais anteriores da base vítrea formam a ‘alça anterior (*loop*) que se relacionam com a patogênese da proliferação vítrea anterior.

Hogan (1963) demonstrou que, em região de corpo ciliar, pars plana e ora serrata o vítreo está firmemente aderido (inserção radial das fibrilas colágenas), e que a tentativa de separá-lo produz descolamento do epitélio ciliar e descolamento entre retina e coróide (Figura 4). Na zona de 2mm à 3mm posteriormente à ora serrata, as fibrilas de colágeno inserem-se paralelamente, na membrana basal da retina neurosensorial adjacente (membrana limitante

interna - MLI), responsável pela adesão vítreo-retiniana à base vítrea, entretanto, em direção posterior, tornam-se atenuadas, apresentando menor densidade de fibrilas no nível do córtex vítreo.



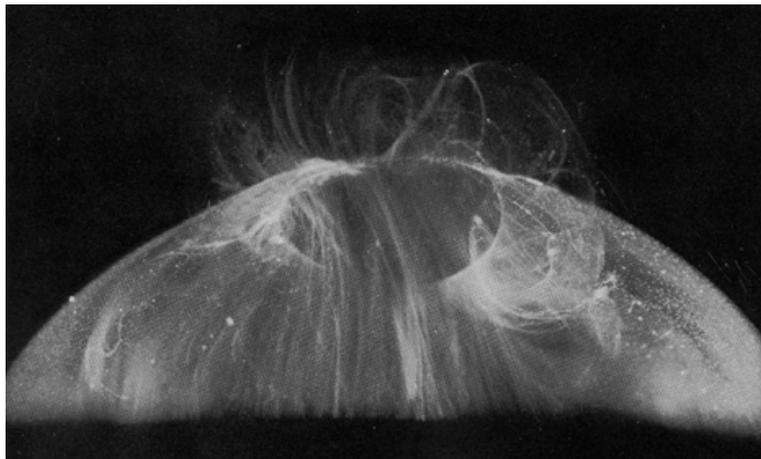
**Figura 4.** Corpo vítreo obtido de autópsia de uma criança de 9 meses de idade. A coróide (seta) e esclera foram dissecadas, sendo que, em suas partes anteriores permaneceram aderidas ao corpo vítreo (seta). A porção anterior da retina (seta) se encontra aderida ao gel vítreo devido à forte aderência da base vítrea. Devido à idade do doador, observa-se a integridade anatômica do vítreo (Fonte: SEBAG, 1989, p. 37)

### 1.3.2 Córtex vítreo

O córtex vítreo é definido como a porção externa do corpo vítreo que se estende anteriormente à base vítrea, formando o 'córtex vítreo anterior' e, posteriormente, conformando a superfície interna da retina neurosensorial, formando o 'córtex vítreo posterior'.

O córtex vítreo anterior apresenta espessura média de 80 $\mu$ m à 200 $\mu$ m, apresentando conexões entre suas fibrilas corticais e as fibrilas colágenas vítreas anteriores. Por sua vez, o córtex vítreo posterior apresenta espessura média de 100 $\mu$ m à 110 $\mu$ m, consistindo de fibrilas colágenas justapostas em camadas impactadas e unidirecionais (BALAZS, 1984).

No nível de papila do nervo óptico, não existe vítreo cortical, e, no nível macular, o córtex apresenta uma diminuição de espessura devido à rarefação de fibrilas colágenas. Com isso, a região peripapilar do vítreo cortical posterior apresenta contorno bem definido de sua circunferência (Anel de Weiss) (Figura 5), podendo ser evidenciada clinicamente ao descolamento do vítreo posterior (GREEN, 1989).



**Figura 5.** Análise morfológica em biomicroscopia de campo escuro de córtex vítreo humano em pólo posterior (Fonte: SEBAG, 1989, p. 48)

Quanto à interação vítreo macular, acredita-se estar relacionada aos aspectos referentes à MLI, que se apresenta bem mais espessa no pólo posterior, com exceção feita à região foveal (onde a MLI encontra-se com baixa espessura). Acredita-se que o aumento da espessura da membrana limitante interna adjacente esteja diretamente relacionado com diminuição da adesão na interface vítreo-retiniana. Portanto, a presença de placas de adesão

perifoveais e a pequena espessura da MLI foveal contribuem na forte adesividade do córtex vítreo e sua participação na fisiopatologia de entidades de tração vítreomacular, como, por exemplo, o buraco de mácula idiopático.

O córtex vítreo abriga os hialócitos, que se encontram dispostos esparsos em uma única camada, aproximadamente 50 $\mu$ m da membrana limitante interna no pólo posterior, e, principalmente, adjacente à via pars plana em base vítrea (BALAZS; OZANICS, 1982). Balazs (1954, 1959) afirmou que os hialócitos se localizam em porções de maior concentração de ácido hialurônico, sugerindo que estas células sejam responsáveis pela sua síntese. No entanto, outros autores afirmam que existem evidências de que os hialócitos não participem da síntese de ácido hialurônico, mas, sim, da síntese de glicoproteínas (RHODES, 1982; JACOBSON, 1984), ou mesmo de fibrilas colágenas. Adicionalmente, funções fagocitárias são atribuídas a essas células (BLOOM; BALAZS, 1965) e, possivelmente, o ácido hialurônico atue de forma reguladora dessa função (FORRESTER; BALAZS, 1980; SEBAG et al., 1981).

### 1.3.3 Membrana basal e interface vítreo-retiniana

A interface vítreo-retiniana, em quase toda a sua extensão, forma-se pela membrana basal, fortemente aderida às estruturas celulares e ao vítreo cortical que se insere em sua superfície. O espaço anular pericristaliniano é a única região não adjacente à membrana basal, onde o vítreo cortical apresenta-se exposto diretamente aos processos zonulares e ao humor aquoso, proveniente da câmara posterior, possibilitando um fluxo bidirecional do humor aquoso e outros elementos entre os segmentos anterior e posterior (BALAZS; DENLINGER, 1982).

A membrana basal é formada por colágeno tipo IV e glicoproteínas (principalmente fibronectina e laminina). Em sua porção adjacente ao corpo ciliar e pars plicata, trata-se de

uma malha reticular de aproximadamente  $0,05\mu\text{m}$  à  $1\mu\text{m}$  de espessura, que preenche os espaços entre as criptas do epitélio ciliar.

Enquanto posterior à ora serrata, trata-se da membrana basal das células de Muller, conhecida como ‘membrana limitante interna’ da retina, que apresenta variação de espessura, dependendo de sua topografia. Por exemplo, no equador, apresenta aproximadamente,  $0,3\mu\text{m}$  de espessura, sendo que no pólo posterior existe um aumento de, aproximadamente, seis vezes ( $1,8\mu\text{m}$ ) (GREEN, 1989).

A MLI é formada por três lâminas: lâmina rara interna, lâmina densa e lâmina rara externa. A lâmina rara apresenta espessura de aproximadamente  $0,03\mu\text{m}$  à  $0,06\mu\text{m}$  e não apresenta variação de espessura entre diferentes topografias, idade ou espécies. Já a lâmina densa, mais espessa no pólo posterior do que no equador e base vítrea, mostra-se mais fina na fóvea ( $0,01\mu\text{m}$  à  $0,02\mu\text{m}$ ) e na papila ( $0,01\mu\text{m}$  à  $0,07\mu\text{m}$ ) (YAMADA, 1969; ANDERSON, 1970; FOOS, 1972b).

A superfície anterior da membrana limitante apresenta-se sempre regular, enquanto sua face posterior apresenta-se bastante irregular conformando a superfície adjacente da retina neurosensorial (FOOS, 1972b). Esta característica torna-se marcante principalmente no pólo posterior, quando comparado à região equatorial onde ambas faces apresentam-se lisas e regulares.

A MLI interrompe sua progressão na rima da papila do nervo óptico, onde está presente a membrana de Elshinig (50nm), que se trata de uma membrana basal da astroglia do nervo óptico e glicosaminoglicanas, que compõe as irregularidades de superfície, as quais se tornam substratos de eventos celulares proliferativos do nervo óptico (HEERGAARD; JENSEN; PRAUSE, 1988). Os sítios de adesão mais intensa da superfície vítreo-retiniana estão, sabidamente, na região de base vítrea, peripapilar, sobre os vasos e região foveal. Foos (1972b) descreveu estruturas denominadas de ‘placas’ de adesão entre as células de Muller e

MLI predominantemente em base, equador vítreo e região perifoveal. Contudo, nesses sítios, as fibrilas colágenas parecem atravessar a lâmina rara, contribuindo para formação das denominadas placas de adesão. Entretanto, existem evidências de sítios atípicos de adesão vítreo em estruturas vasculares que podem ser responsáveis por eventos hemorrágicos e proliferativos associados à tração vítreo-retinianas (MUTLU; LEOPOLD, 1964).

Além de evidências quanto à espessura da MLI e sua relação com a adesividade vítreo-retiniana, e a existência de pontos e placas de ancoramento das fibrilas de colágeno em sua superfície, sabe-se, no entanto, que a MEC presente na interface vítreo-retiniana é diretamente responsável pela adesão celular (principalmente, as glicoproteínas, como a fibronectina e a laminina). Os principais sítios de ligação entre a MEC e a célula são os receptores da superfície celular, chamados integrinas (INGBER, 1991; ELNER; ELNER, 1996). Por meio de seqüências de aminoácidos presentes na estrutura molecular das glicoproteínas, interagem com as integrinas, altamente ligadas à fibronectina e à laminina, que são exatamente os constituintes da MLI presente na interface vítreo-retiniana (RUOSLAHTI, 1991).

#### **1.4 Funções do vítreo**

O crescimento e o perfeito desempenho funcional do globo ocular envolvem a participação de vários tecidos e a adequada relação geométrica entre eles. Acredita-se que a retina seja responsável na indução de fatores de crescimento que se tornam possíveis pela influência e desenvolvimento do corpo vítreo (CURTIN, 1985). Por volta da quinta semana de gestação, após o fechamento da fissura coroidal, o vítreo torna-se um sistema fechado, que proporciona, com sua expansão, o desenvolvimento embrionário do globo ocular. Assim,

pesquisadores concluíram que o crescimento do olho depende do crescimento do vítreo, de diferentes fatores relacionados e forças geradas por ele (BALAZS, 1984).

Proporcionar transparência de meio é uma das principais funções do vítreo. Devido à estrutura molecular da cadeia de fibrilas de colágeno de pequeno diâmetro, dispostas de maneira esparsa inter-relacionados com ácido hialurônico em grande quantidade, o vítreo minimiza a dispersão de luz e preserva a manutenção da transparência de meio. Adicionalmente, para que a transparência seja preservada, acredita-se que o ácido hialurônico tenha um papel importante - peneira molecular - na inibição do influxo de macromoléculas e células. Graças à sua propriedade viscoelástica e, conseqüentemente, de uma capacidade de absorção das ondas de choque, o vítreo promove a proteção das estruturas oculares internas durante a movimentação ocular e atividade física (BALAZS, 1984).

Outra propriedade do vítreo que merece destaque é a capacidade mecânica do córtex vítreo de tamponar algumas roturas retinianas, impedindo a passagem de líquido para o espaço subretiniano e prevenindo o descolamento de retina. Ainda em relação ao descolamento de retina, o vítreo apresenta a propriedade de inibição da migração e proliferação celular, por meio do equilíbrio de fatores intrínsecos responsáveis pelo adequado processo cicatricial do vítreo.

A capacidade de difusão transvítrea consiste num fluxo contínuo de fluido do vítreo pelo parênquima retiniano, e auxilia na aposição retiniana ao complexo epitélio pigmentar retiniano (EPR)/coriocapilar (FOULDS, 1985).

### 1.5 Evolução e maturação do vítreo

Acredita-se na existência de uma constante síntese de colágeno e ácido hialurônico. A produção de ácido hialurônico contribui não somente para o crescimento da estrutura ocular, como também para aumentar a transparência do vítreo, ampliando o espaço entre as fibrilas colágenas da cavidade vítrea. Quanto ao colágeno, sua concentração não aumenta apreciavelmente durante o crescimento do vítreo, com isso, observa-se uma ligeira queda em sua densidade, o que poderia desestabilizar o arcabouço, não fosse o aumento de ácido hialurônico, que consegue, até certo ponto, estabilizar a fina estrutura fibrilar de colágeno (BALAZS, 1984). Sabe-se, entretanto, que, durante o envelhecimento, a síntese do colágeno sofre alterações em sua configuração molecular (SNOWDEN; EYRE; SWANN, 1982).

Essas alterações moleculares proporcionam um sólido substrato às alterações morfológicas da maturação do corpo vítreo. Na fase adulta, o vítreo apresenta importantes modificações morfológicas, como a presença de bandas macroscópicas de fibras colágenas em curso ântero-posterior e com inserção em base vítrea, que, teoricamente, se trata de possível reorganização de cadeias colágenas, já que elas não apresentam síntese significativa em fase adulta. Outra teoria é a dissociação entre colágeno e ácido hialurônico, resultando em agregação das fibrilas em bandas e formação de áreas adjacentes (bolsões) de acúmulo de ácido hialurônico (SEBAG; BALAZS, 1985, 1989). Conseqüentemente, evidencia-se a formação do 'líquido vítreo' durante o processo de maturação, evento essencial na patogênese do descolamento do vítreo posterior.

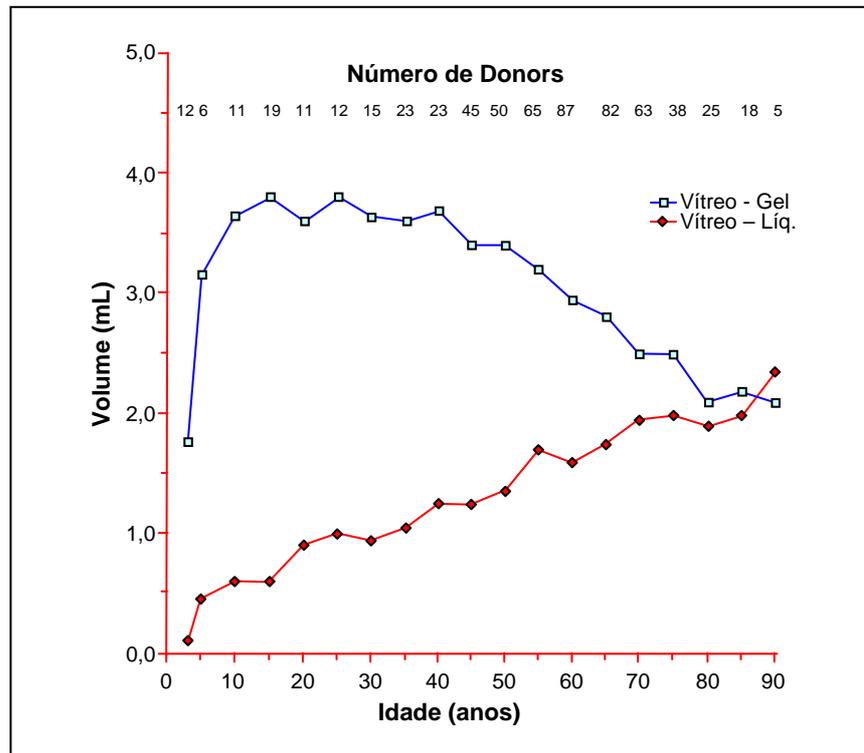
## 1.6 Reologia do vítreo

Trata-se do termo que se refere à dinâmica de fluxo e ao estado do corpo vítreo - líquido ou gelatinoso.

Estudos baseados na biomicroscopia e, mais tarde, confirmados qualitativa e quantitativamente evidenciaram importantes modificações que influenciam na dinâmica e no papel do vítreo e sua potencial relação com as estruturas oculares, como a diminuição do volume do gel vítreo e o aumento do volume líquido vítreo após quatro ou cinco décadas de vida (BUSSACA, 1958; GOLDMANN, 1962; EISNER; BACHMANN, 1974; O'MALLEY, 1976).

A liquefação vítrea inicia-se relativamente precoce, podendo ser evidenciada ao exame clínico e ultrasonográfico. Autores demonstraram a presença de vítreo líquido após o quarto ano de vida, sendo que, aos 18 anos, 20% do vítreo apresenta-se liquefeito (BALAZS; FLOOD, 1978; BALAZS; DENLINGER, 1982). Contudo, é na oitava e nona década de vida, que mais da metade do vítreo apresenta-se no seu estado líquido (Figura 6).

Por outro lado, estudos científicos sobre alterações bioquímicas do vítreo relacionadas à idade, evidenciaram que a quantidade total, tanto de colágeno quanto do ácido hialurônico, não sofre alteração absoluta, mas, sim, apresenta uma redistribuição em suas concentrações entre os vítreos líquido e gelatinoso. Por exemplo, o colágeno sofre agregação em bandas, aumentando sua concentração no gel vítreo, enquanto o ácido hialurônico, devido à desagregação da cadeia, concentra-se em maior quantidade no vítreo líquido (CHAKRABARTI; HULTSCH, 1976).



**Figura 6. Liquefação do vítreo humano. O vítreo humano de diferentes idades, em estado gel e líquido, foi coletado e o volume aferido após o óbito em diferentes idades. A presença do vítreo líquido é evidenciada, aproximadamente, aos 5 anos de idade, atingindo mais de 50% do volume total por volta da sétima década. O volume de vítreo gel aumenta durante a primeira década devido ao crescimento ocular, iniciando sua regressão na quarta década paralelamente ao aumento do vítreo líquido (Fonte: SEBAG, 1989, p. 81)**

De acordo com Balazs (1984) e Sebag e Balazs (1985), o vítreo central sofre primariamente o processo de liquefação, consistente com o conceito de dissolução da cadeia colágeno-ácido hialurônico, culminando na formação do vítreo liquefeito e na agregação das fibras do colágeno em bandas paralelas e em direção ântero-posterior, com inserção na base vítrea (SEBAG, 1987, 1989; SEBAG; BALAZS, 1989).

O mecanismo de liquefação e remodelação vítrea não é inteiramente compreendido, no entanto, sabe-se que a transição do estado de gel para líquido vítreo está relacionada com a

desestruturação da cadeia colágeno-ácido hialurônico, resultando em diminuição da viscosidade e aumento da liquefação. Kamei e Totani (1982), entretanto, demonstraram que a liquefação é relacionada com alterações moleculares dos glicosaminoglicanas (sulfato de condroitina e heparan sulfato). Andley e Champman (1984) atribuíram a liquefação vítrea relacionada à idade à mudança na conformação terciária da molécula de ácido hialurônico, induzida pela presença de radicais livres (oxigênio *singlet*). Portanto, os efeitos cumulativos de fotossensibilidade e processos metabólicos produziram radicais livres, que influenciariam a estrutura da cadeia molecular vítrea, participando da patogênese de diversos eventos intra-oculares.

Além dos fatores mencionados anteriormente, uma cadeia enzimática relacionada à modelação da MEC participa dos processos fisiológicos e patológicos do vítreo. As metaloproteinases (MMPs) consistem em um grupo de enzimas (endopeptidases) envolvidas no processo de degradação da matriz extracelular, sendo que suas atividades são reguladas naturalmente por um grupo de inibidores teciduais endógenos naturais das metaloproteinases (TIMPs – *tissue inhibitors of metalloproteinases*), que têm por objetivo manter o equilíbrio bioquímico/estrutural das matrizes extracelulares. As MMPs são secretadas na forma de proenzimas (forma inativa), que se transformam após a exclusão de seu terminal amino, na forma madura e ativa da enzima. De forma dinâmica, os TIMPs, por sua vez, atuam restringindo a conversão da proenzima para sua forma ativa, mantendo o equilíbrio da estrutura molecular da matriz extracelular. Apesar do limitado conhecimento no mecanismo de ação das MMPs e das TIMPs na cavidade vítrea normal e em processos patológicos diversos, existem evidências de mutações de TIMPs em condições genéticas que podem ser responsáveis por manifestações fenotípicas da cavidade vítrea (De La PAZ et al., 1998).

## **1.7 Alterações morfológicas relacionadas à idade**

### **1.7.1. Membrana limitante interna (MLI)**

De maneira geral, com a idade, ocorre um espessamento de todas as membranas basais do corpo humano. A MLI, a membrana basal da interface vítreo-retiniana, comporta-se de maneira semelhante. Hogan, Alvarado e Weddell (1971) sugeriram que a MLI seja produzida pelas células de Muller, apesar de ainda não estar clara a causa do espessamento relacionado à idade. Talvez, com o passar dos anos, devido à aderência e às forças aplicadas do vítreo cortical sobre a superfície retiniana, possa se desencadear o aumento em sua síntese, resultando no espessamento dessa estrutura. Entretanto, é sabido que tal espessamento é responsável pelo enfraquecimento da junção vítreo-retiniana, com isso, exercendo papel determinante na fisiopatologia do descolamento do vítreo posterior.

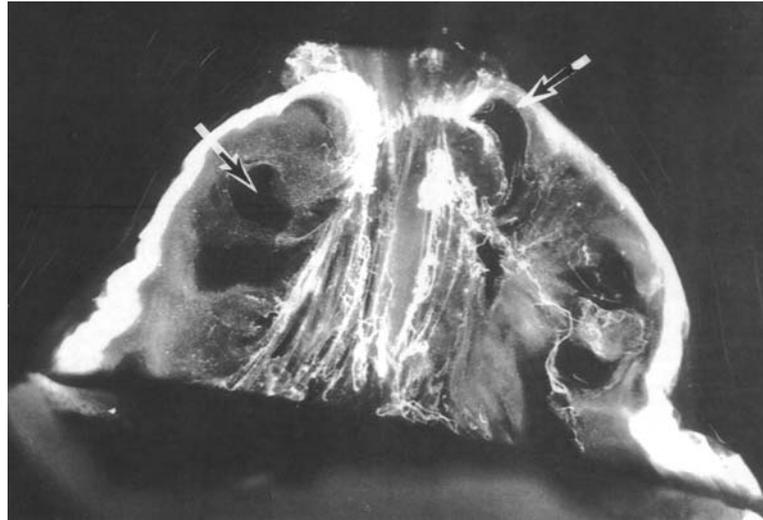
### **1.7.2 Base vítrea**

Como abordado anteriormente, a base vítrea sofre alterações relacionadas à aglomeração de bandas proeminentes de fibrilas colágenas, havendo um alargamento de sua inserção (de 1mm para 3mm), posteriorizando-a (mais próxima ao equador), sendo que se evidencia clinicamente o diagnóstico de roturas periféricas e o descolamento de retina em áreas correspondentes (TENG; CHI, 1957).

### **1.7.3 Corpo vítreo**

Também abordado anteriormente, a mais importante modificação na cadeia estrutural do corpo vítreo trata-se da redistribuição do colágeno e do ácido hialurônico. A morfologia altera-se de maneira importante, com a formação de cavidades de vítreo líquido, permeadas por fibras colágenas tortuosas e espessadas (SEBAG, 1987) (Figura 7). Contudo, segue-se o

colapso do vítreo gel secundário à migração do vítreo líquido, que penetra no espaço retrohialídeo através do anel de Weiss, provocando, gradualmente, a clivagem da junção vítreo-retiniana, e, subseqüentemente, caracterizando o descolamento do vítreo posterior.



**Figura 7.** Biomicroscopia em campo escuro do corpo vítreo na terceira idade. As fibras colágenas centrais espessam-se, tornando-se tortuosas, enquanto a periferia do vítreo apresenta regiões que contêm vítreo líquido correspondente a lacunas (setas) (Fonte: SEBAG; HAGEMAN, 2000, p. 44)

### **1.8 Descolamento do vítreo posterior (DVP)**

Trata-se de um dos eventos do vítreo mais comuns relacionados à sua maturação, que pode ser definido pela separação entre o córtex vítreo e a MLI (HOGAN, 1963; FOOS, 1972b).

O processo fisiopatológico do descolamento do vítreo posterior (referente à senilidade) encontra-se intimamente relacionado com o processo de liquefação vítrea e, simultaneamente, com o enfraquecimento da interface vítreo-retiniana. Contudo, como discutido anteriormente,

o vítreo sofre uma desestruturação de sua cadeia molecular, o que leva, invariavelmente, ao colapso do corpo vítreo, e este, por sua vez, exerce uma força em direção anterior, o que contribui para clivagem da interface vítreo-retiniana (a qual se encontra espessada e enfraquecida em razão do processo de maturação). Concomitantemente a esse processo, ocorre a migração de vítreo líquido para o espaço retrocortical através dos orifícios cortical peripapilar, induzindo a dissecação hídrica da interface vítreo-retiniana, e, por conseqüência, a extensão do descolamento do vítreo (FOOS, 1972a; FOOS; GLOOR, 1975; SEBAG, 1991).

Em estudo epidemiológico, evidenciou-se a incidência de descolamento do vítreo em 53% dos pacientes acima de 50 anos e em 65% dos pacientes acima de 65 anos (LINDNER, 1966). Sabe-se, também, que o descolamento do vítreo apresenta-se mais freqüente em pacientes míopes, submetidos à cirurgia intra-ocular e sujeitos aos processos uveíticos (HYAMS; NEUMANN; FRIEDMAN, 1975).

Contudo, apesar da liquefação e do descolamento do vítreo posterior tratarem-se de um fenômeno fisiológico e irreversível para a maioria da população, podem acompanhar-se de dois sintomas freqüentemente implicados em processos patológicos - *floaters* e *flashes*. Os *floaters*, aglomeração de fibrilas vítreas e tecido glial, trata-se do sintoma mais freqüentemente associado a esse processo, caracterizado durante a movimentação ocular e a incidência de luz, que provocam a percepção de sombreamento de diferentes formas projetadas na retina (GREEN, 1989). Por sua vez, os *flashes*, freqüentemente relacionados ao processo de descolamento do vítreo, traduzem-se na tração mecânica do folheto retiniano, sendo este transformado em percepção visual que se relaciona intimamente na formação de rasgaduras retinianas (MOORE, 1935).

No entanto, o córtex vítreo apresenta adesões mais fortes na região peripapilar e foveal, o que relaciona o descolamento do vítreo posterior à fisiopatologia de doenças maculares, como buraco de mácula idiopático, retinopatia diabética, síndrome da tração

vítreomacular e outras. Como, por exemplo, na membrana epiretiniana, onde o descolamento do vítreo e sua adesão segmentar na superfície macular (remanescência cortical de superfície) apresentam-se como fator diretamente implicado em sua patogênese (SEBAG, 2003).

Adicionalmente, em pacientes pediátricos, existe uma forte adesão da interface vítreo-retiniana, o que torna a separação do vítreo posterior extremamente difícil, mesmo com o emprego de força mecânica durante a cirurgia de vitrectomia, sendo responsável por complicações trans e pós-operatórias, que podem levar à perda irreversível de visão (como rasgaduras, hemorragias e proliferação vítreo-retiniana) (MARGHERIO et al., 1998).

## **1.9 Descolamento anômalo do vítreo posterior**

Em virtude da semelhança clínica com o descolamento do vítreo posterior e de implicações intimamente ligadas ao processo de vitreólise farmacológica, existem especiais circunstâncias que merecem considerações. Tais situações podem ser divididas em duas categorias: ruptura do tecido retiniano e ruptura longitudinal do córtex vítreo (*vitreosquise*).

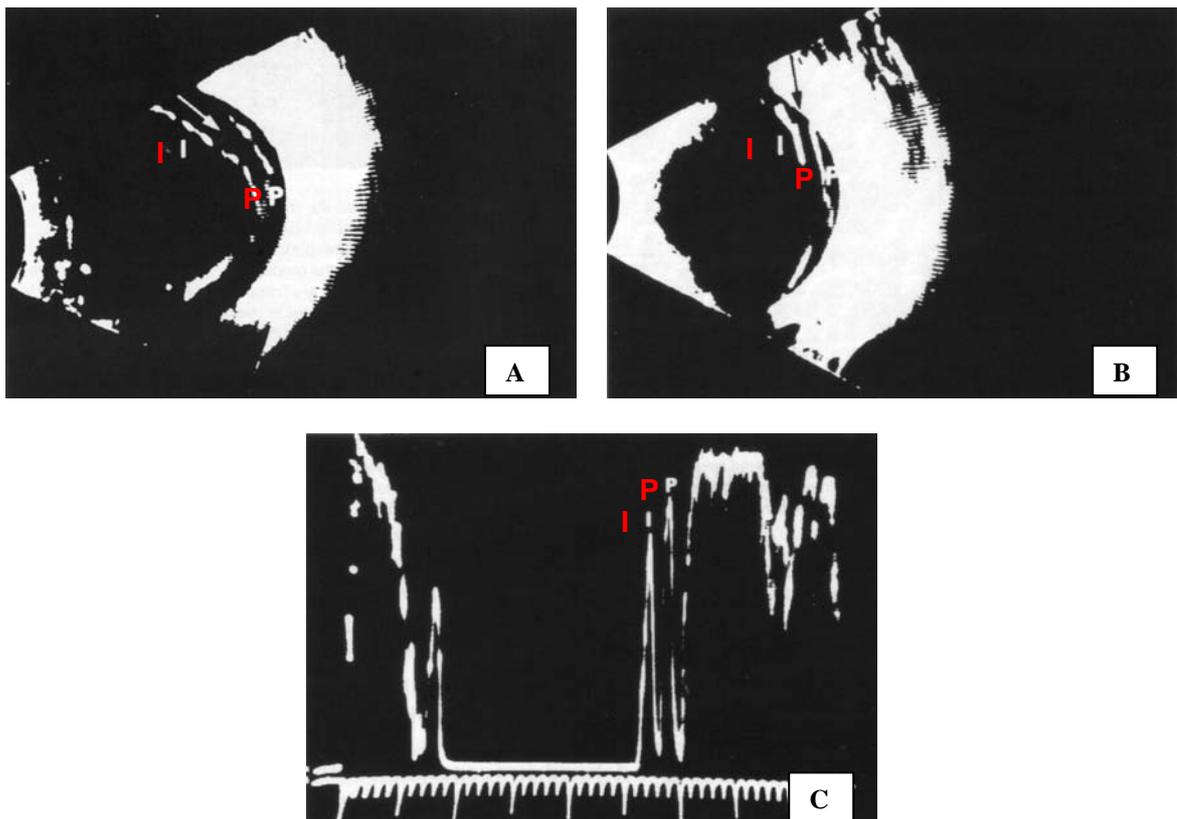
### **1.9.1 Ruptura do tecido retiniano**

Ao contrário da separação fisiológica da junção vítreo-retiniana, a tração vítrea pode trazer dano à retina neurosensorial. Lindner (1966) evidenciou discreta hemorragia vítrea em 13% a 19% dos descolamentos de vítreo posterior, que são considerados um fator de risco na gênese da rotura retiniana. Em algumas patologias que apresentam processo degenerativo em interface e aumento importante da liquefação vítrea, como, por exemplo, nas doenças relacionadas à displasia do tecido conectivo (síndrome de Marfan, Ehlers-Danlos e síndrome de Stickler), a formação de roturas retinianas é bastante freqüente e de difícil tratamento

(MAUMENEE, 1979). Portanto, a ausência de deiscência fisiológica da junção vítreo-retiniana predispõe a alto risco na formação de rasgaduras e descolamentos polimorfos de retina.

### 1.9.2 Ruptura longitudinal do córtex vítreo (*Vitreosquise*)

Muito comumente não diagnosticada ou confundida com descolamento do vítreo, a *vitreosquise* trata-se da separação laminar entre a porção anterior e posterior do córtex vítreo, sendo que a porção anterior desloca-se anteriormente, permanecendo a porção posterior aderida no parênquima retiniano (Figura 8).



**Figura 8.** Vitreosquise (separação intrínseca do córtex vítreo que mimetiza descolamento do vítreo posterior), evidenciada ao ultrassom B-scan (A e B) e A-scan (C). Parede externa do córtex (P) e parede interna do córtex (I) (Fonte: SEBAG; HAGEMAN, 2000, p. 54)

Recentemente, foi estudada sua implicação na fisiopatologia da retinopatia diabética, sendo que em alguns casos, também responsável pela formação de membrana epiretinianas e buracos maculares, em que se apresenta diretamente responsável pelo fator tracional persistente devido à permanência da lâmina posterior do córtex vítreo, enquanto sua porção anterior descola-se em direção à cavidade, simulando o descolamento do vítreo posterior clássico (SEBAG, 1996, 2003).

### **1.10 Vitrectomia farmacológica**

Há aproximadamente uma década, vários estudos científicos concentram-se na efetiva incorporação de agentes farmacológicos no tratamento de patologias vítreo-retinianas (VERSTRAETEN et al., 1993; HAGEMAN; RUSSELL, 1994; TEZEL; Del PRIORE; KAPLAN, 1998).

Contudo, dois são os objetivos principais na abordagem farmacológica:

- 1) Liquefação vítrea; e
- 2) Clivagem da interface vítreo-retiniana.

De maneira sucinta, como abordado anteriormente em nossa revisão literária, o vítreo trata-se de um tecido translúcido e viscoelástico formado por MEC, que preenche o segmento posterior, com a função de manter o meio translúcido e proteger mecanicamente as estruturas intra-oculares. O gel vítreo é composto de 98% de água, diferentes tipos de colágenos, ácido hialurônico, proteoglicanas e glicoproteínas, organizados em um arcabouço estrutural hidrofílico tridimensional (BISHOP, 1996, 2000).

A interpenetração das fibrilares colágenas, é a responsável pelo aspecto sólido, e as moléculas hidrofílicas de ácido hialurônico, responsáveis pelo volume viscoso, constitui o arcabouço do gel vítreo. No entanto, como discutido anteriormente, esta interação colágeno/ácido hialurônico é mediada por um terceiro componente - as glicoproteínas (ex. fibronectina, laminina) e proteoglicanas (ex. sulfato de condroitina, sulfato de ceratan). Estas moléculas exercem a função de interconexão, ocupando os espaços interfibrilares e concedendo a adesão intrínseca da MEC, e, ao mesmo tempo, preservando a translucidez do meio (SCOTT, 1992).

O vítreo cortical consiste em uma densa camada de colágeno do tipo 2 e outros componentes da MEC, localizado em sua porção externa, que se estende desde à base vítrea anterior (vítreo cortical anterior) até ao pólo posterior (vítreo cortical posterior). Apesar de não haver conexão direta entre o vítreo posterior e o parênquima retiniano, o vítreo cortical, em condições normais, é bastante aderido à MLI da retina. A exata natureza da adesão vítreo-retiniana não é totalmente conhecida. No entanto, acredita-se que seja secundária às propriedades de diferentes MEC encontradas na interface (FOOS, 1972b; BISHOP, 1996).

No aspecto clínico, o vítreo exerce um papel crucial na patogênese e evolução de várias desordens vítreo-retinianas. Graças à abordagem cirúrgica da cavidade vítrea, inicialmente desenvolvida por Machemer no começo da década de 70, o que seria impossível há uma geração, a preservação da visão de milhares de pacientes tornou-se realidade (MACHEMER et al., 1971). Apesar dos grandes avanços trazidos pela abordagem cirúrgica convencional, existe uma enorme necessidade socioeconômica, associada aos menores efeitos colaterais secundários e a uma abordagem potencialmente menos invasiva - a “vitrectomia farmacológica”.

Vários agentes têm sido estudados durante a última década, porém nenhum deles atingiu suficiente sucesso para aplicabilidade clínica. A seguir, iremos abordar os diferentes

agentes, em sua maioria, enzimas, e suas ações em diversos sítios da MEC, utilizadas no processo de vitreólise.

#### 1.10.1. Hialuronidase

Desde 1949, esta enzima tem sido usada em trabalhos experimentais na liquefação do gel vítreo (PIRIE, 1949). Trata-se de um agente que atua na degradação do ácido hialurônico, importante elemento que compõe o arcabouço vítreo. A forma purificada da enzima utilizada no passado, Vitrase<sup>®</sup>, tem sido empregada na Fase III do estudo da FDA (*Food and Drug Administration*) para determinar sua eficácia no clareamento vítreo de pacientes diabéticos com hemorragia vítrea sem a intervenção cirúrgica (THOMAS et al., 2000). Tal abordagem desperta muito interesse clínico, pois pacientes com retinopatia diabética (não-proliferativa ou proliferativa incipiente) podem beneficiar-se de uma liquefação precoce e indução indireta do descolamento do vítreo posterior (DVP). Portanto, melhorando o prognóstico evolutivo da retinopatia, secundário à ausência do substrato para proliferação de neovasos retinianos (corpo vítreo descolado).

Inicialmente, foi proposta a sua utilização na indução do DVP, apesar da existência de pequena base teórica para confirmação dessa hipótese. A hialuronidase não manifesta influência direta em estruturas moleculares presentes na interface vítreo-retiniana. No entanto, em algumas séries, foi evidenciado o aumento no índice de DVP, mas, possivelmente, secundário à inflamação intra-ocular provocada pela injeção intravítrea da enzima. Por meio da indução de um processo de sinérese farmacológica, pode se traduzir no aumento da roturas retinianas iatrogênicas. Portanto, existem fortes evidências de que a hialuronidase promove a liquefação vítrea, apresentando limitada ação na interface vítreo-retiniana.

No contexto atual, percebe-se uma potencial utilização dessa enzima como adjuvante em procedimentos vítreos de pequena incisão, facilitando a liquefação vítrea pré-operatória, e, conseqüentemente, encurtando o tempo e aumentando a eficácia do procedimento.

#### 1.10.2 Plasmina

Atualmente, é uma das enzimas mais estudadas em vitrectomia farmacológica e com grande potencial na sua utilização em estudos clínicos (VERSTRAETEN et al., 1993; MARGHERIO et al., 1998; MEN et al., 2004). Trata-se de uma enzima não específica, que tem ação sobre a laminina e a fibronectina, dois componentes da MEC presentes na MLI, sabidamente estrutura implicada na adesão da interface vítreo-retiniana.

Verstraeten et al., em 1993, em estudo experimental pioneiro (em olhos de coelhos), evidenciaram que a utilização de plasmina intravítrea mostrou-se útil adjuvante à cirurgia de vitrectomia na indução de DVP. Subseqüentemente, Margherio et al. (1998) apresentaram uma série de casos (buracos de mácula traumáticos em pacientes pediátricos), em que a plasmina facilitou a indução cirúrgica do DVP. No entanto, a plasmina utilizada nos primeiros estudos foi de origem bovina, o que causou dificuldade na aprovação de protocolos e instalação de estudos multicêntricos. Com isso, Dr. Trese e colaboradores, preconizadores de sua utilização, desenvolveram um kit para obtenção da plasmina autóloga e subseqüente utilização durante o procedimento cirúrgico (comunicação pessoal).

Atualmente, existe em andamento um estudo clínico, realizado por dois centros americanos (Royal Oak, MI e Durham, NC), na avaliação de plasmina durante a cirurgia de vitrectomia para buraco de mácula graus 2 e 3.

Em estudos experimentais preliminares, realizados por nós em 2001 (dados não publicados), utilizando o kit para obtenção de plasmina autóloga, foram observados sinais de liquefação vítrea após 30 minutos da injeção enzimática. Além da hidrolização de

glicoproteínas da interface vítreo-retiniana, existem hipóteses baseadas em evidências científicas de que a plasmina é responsável também pela liquefação vítrea mediante a ativação de metaloproteinase (enzima intrínseca da cavidade vítrea responsável pelo processo fisiológico de sinérese vítrea).

Outro estudo experimental (HIKICHI et al., 1999), associando plasmina com injeção de gás (SF<sub>6</sub>), demonstrou resultados interessantes quanto à eficácia na indução do DVP comparado com injeção isolada de gás intravítreo.

Recentemente, foi publicado um estudo experimental onde se utilizou tecnologia recombinante, tendo como vantagem a praticidade em sua obtenção e esterelidade, na produção de plasmina dentro da cavidade vítrea (através da injeção intravenosa de plasminogênico e uroquinase) associada com injeção de SF<sub>6</sub>, reproduzindo resultados similares a estudos anteriores (MEN et al., 2004).

### 1.10.3 Dispase

Trata-se de uma enzima com atividade proteolítica da fibronectina e colágeno do tipo 4, componentes que constituem, juntamente com a laminina, a estrutura molecular da membrana limitante interna (STENN et al., 1989).

Estudos preliminares demonstraram que sua atuação, de relativa especificidade pelos componentes da junção vítreo-retiniana, traduziu-se na ruptura de fibrilas colágenas adjacentes e perda da lâmina rara externa e alteração na regularidade de superfície na lâmina densa da MLI, com preservação de estruturas retinianas subjacentes. Portanto, os investigadores concluíram que a dispase não induziria efeitos colaterais na retina, pois as extensões das células de Muller permaneceram intactas (TEZEL; Del PRIORE; KAPLAN, 1998).

Em 2000, por meio de um estudo preliminar experimental não controlado em olhos de suínos jovens (onde existe forte adesão vítreo-retiniana), nosso grupo confirmou evidências preliminares, de que a dispase facilitou a separação do vítreo posterior durante a sua indução mecânica na vitrectomia via pars plana (OLIVEIRA et al., 2000). Nesse mesmo estudo, foi possível evidenciar a importância do estabelecimento da concentração e tempo de atuação intravítrea da enzima, para que se viabilizasse a utilização deste agente, pois, em estudos anteriores, a mesma enzima foi utilizada em altas doses para a produção de ruptura tecidual e, secundariamente, a proliferação vítreo-retiniana (FRENZEL et al., 1998).

É importante destacar que, com o uso da dispase, não foram evidenciados sinais de liquefação vítrea, confirmando, teoricamente, a especificidade proteolítica pela junção vítreo-retiniana.

#### 1.10.4 Condroitinase

No início da década de 90, estudos de imunofluorescência detectaram intensa reatividade de anticorpos contra sulfato de condroitinase na interface vítreo-retiniana de olhos de macacos e humanos, principalmente em região peripapilar e base vítrea (HAGEMAN et al., 1989). Tais evidências levaram a estudos pilotos (*in vivo* em olhos de macacos e olhos de doadores humanos), em que foi documentada a eficácia da condroitinase no descolamento de base vítrea como adjuvante à vitrectomia (HAGEMAN; RUSSELL, 1994).

Baseados nos estudos preliminares, no final da década de 90, foi completado a fase I do estudo clínico, mas os resultados não foram publicados, e a fase II ainda não foi iniciada.

#### 1.10.5 RGD peptide

Diferentemente dos demais agentes estudados, o RGD peptide trata-se de um peptídeo sintético de cadeia curta (Gly-Arg-Gly-Glu-Ser-Thr-Pro), que, em associação à cirurgia

vítreo-retiniana em olhos de coelhos, foi descrito por nosso grupo, em 2002, com o propósito de utilização no campo da vitrectomia farmacológica (OLIVEIRA et al., 2002).

Como abordado anteriormente, apesar da evolução dos conhecimentos sobre adesão vítreo-retiniana, a compreensão de sua fisiologia ainda não é totalmente esclarecida. Baseados em estudos histológicos, as fibras colágenas corticais ancoram-se na MLI adjacente aos pedículos da célula de Muller na superfície interna da retina (FOOS, 1972b).

Sabemos, também, que a MEC é um componente crítico na mediação à adesão celular, inclusive da interface vítreo-retiniana (RUSSELL; SHEPHERD; HAGEMAN, 1991). Entretanto, o principal sítio de ligação entre a MEC e a célula são os receptores da superfície celular, chamados integrinas (INGBER, 1991; ELNER; ELNER, 1996). Contudo, as seqüências de ligação Arg-Gly-Asp (seqüência RGD), incorporadas às diferentes moléculas da MEC, são as responsáveis pela interação com as integrinas. Já do lado celular, as integrinas são altamente ligadas à fibronectina e à laminina por meio das seqüências de ligação, que são exatamente os constituintes da MLI presentes na interface vítreo-retiniana (RUOSLAHTI, 1991).

Portanto, a injeção do RGD peptide funciona como um análogo sintético, competindo com as seqüências de ligação específica da MEC, provocando um relaxamento da interação entre as integrinas-MEC e, conseqüentemente, enfraquecendo a adesão da interface vítreo-retiniana (PIERSCHBACHER; RUOSLAHTI, 1987; WILLIAMS, 1992).

Apesar desse estudo controlado não abordar aspectos de toxicidade e possível antigenicidade relacionados com o peptídeo utilizado, potencialmente, abre uma nova perspectiva na abordagem e conceito da vitrectomia farmacológica.

## 2 INTRODUÇÃO

O descolamento do vítreo posterior tem sido tema de vários estudos devido ao seu impacto na evolução natural de inúmeras patologias vítreo-retinianas (SEBAG, 1992), tais como retinopatia diabética proliferativa (WONG; SEHMI; McLEOD, 1989; SEBAG, 1996), trauma ocular (GREGOR; RYAN, 1982), membrana epiretiniana e buraco macular (MARGHERIO et al., 1998).

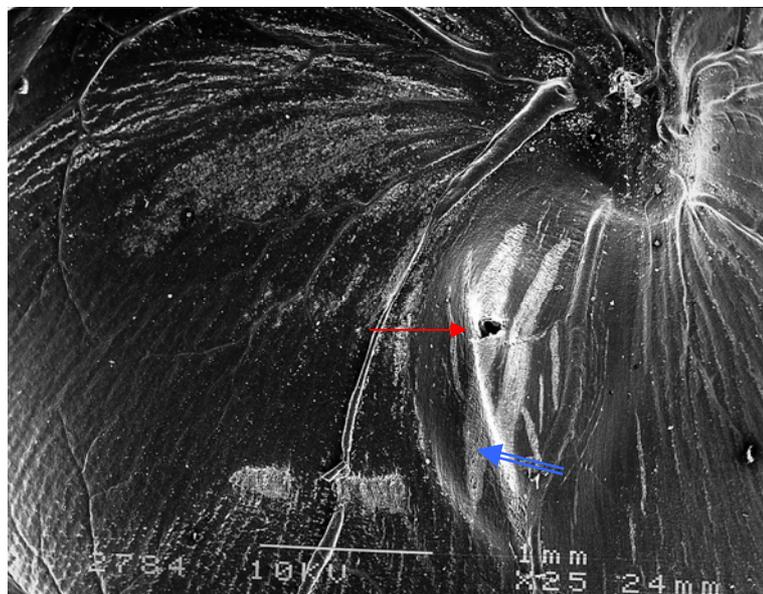
No entanto, o mecanismo fisiológico de adesão da interface entre vítreo e retina permanece indeterminado. É sabido que, adjacente à superfície interna retiniana, se encontra a MLI, um tipo de membrana basal responsável pela junção entre os pedículos da célula de Muller (retina) e o córtex vítreo. Em 1972, Foos (1972a) demonstrou que a junção vítreo-retiniana é composta pelo ancoramento de fibras colágenas do vítreo cortical na membrana limitante interna subjacente à superfície interna retiniana.

Kohno et al. (1987) e Russell, Shepherd e Hageman (1991), mediante imunohistoquímica, demonstraram, na membrana limitante interna, a presença e distribuição de fibronectina e laminina, glicoproteínas conhecidas por suas propriedades de adesão célula-célula e célula-MEC. Adicionalmente, estudos complementares demonstraram a presença de colágeno tipo I e IV (JERDAN; KAO; GLASER, 1986). Portanto, atribui-se à MLI suma importância na estabilização da junção entre o colágeno vítreo e a superfície retiniana (KOHNO et al., 1987; RUSSELL; SHEPHERD; HAGEMAN, 1991).

Apesar da evolução de técnicas em cirurgia de vítreo, o descolamento da hialóide posterior é causa de complicações intra-operatórias. Em crianças e pacientes diabéticos, nos quais o vítreo se encontra extremamente aderido à superfície retiniana, a indução cirúrgica do descolamento da hialóide posterior é, frequentemente, impossível ou associado a rasgaduras

iatrogênicas e hemorragia retiniana durante a vitrectomia mecânica (MARGHERIO et al., 1998).

Recentemente, em estudo experimental realizado em macacos cynomolgus adultos jovens, Russell e Hageman (2001) demonstraram, por meio de imunohistoquímica e microscopia eletrônica, que a separação mecânica do vítreo cortical causa perda do tecido retiniano, incluindo avulsão de células ganglionares, das camadas plexiforme interna e nuclear interna. Esses achados corroboram as evidências de danos induzidos cirurgicamente em nível de interface vítreo-retiniana, podendo ser responsáveis por defeitos do campo visual evidenciados em pós-operatórios de cirurgias no tratamento de buracos maculares. Portanto, esses dados também suportam a tese da necessidade de adjuntos farmacológicos associados ao procedimento mecânico na indução da separação atraumática do descolamento induzido do vítreo posterior (Figura 9).



**Figura 9.** Microscopia eletrônica de varredura da superfície interna de retina de suíno submetido à vitrectomia (estudo preliminar). Em região peripapilar inferior, nota-se rasgadura de retina (seta vermelha) provocada por tração vítreo-retiniana durante indução mecânica do descolamento do vítreo posterior. Subjacente à rotura, nota-se persistência de colágeno do vítreo cortical (seta azul) (25x)

Nesse cenário, a busca de tratamentos menos invasivos e métodos auxiliares no procedimento cirúrgico para descolamento do vítreo, o conceito “vitrectomia farmacológica” tem se mostrado em tendência crescente na literatura (SEBAG, 1998; TANAKA; QUI, 2000). Este conceito é baseado, em parte, no uso de agentes que alteram a organização molecular do corpo vítreo, com o objetivo de reduzir e/ou eliminar indesejáveis conseqüências diretamente relacionadas à tração vítreo-retiniana. Adicionalmente, com o avanço de técnicas de cirurgia vítrea e redução do diâmetro dos instrumentos (25 gauge), com intuito de diminuir a manipulação e o tempo cirúrgico dos procedimentos, agentes farmacológicos que induzam à liquefação vítrea potencialmente aumentariam a eficiência na remoção do gel vítreo.

Contudo, como abordado em nossa revisão literária, diferentes agentes enzimáticos ou não-enzimáticos têm sido pesquisados nos últimos anos (SEBAG, 1998; THOMAS et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001; MEN et al., 2004).

Entre eles, Tezel, Del Priore e Kaplan, em 1998, demonstraram, em olhos enucleados, que a injeção intravítrea de dispase produziu a separação da hialóide posterior da membrana limitante interna com mínimas alterações na porção interna da retina. Embora esse estudo tenha se revelado metodologicamente limitado (fatores pós-mortem e método de avaliação do descolamento do vítreo), a dispase demonstrou características de relativa especificidade à junção vítreo-retiniana.

A dispase é uma protease obtida do *Bacillus polymixia*, usada na digestão da membrana basal em diferentes estruturas anatômicas (SPURR; GIPSON, 1985). Ela atua em colágeno tipo IV e fibronectina (STENN et al., 1989), que são dois dos principais componentes da MLI e responsáveis pela adesividade da interface vítreo-retiniana.

Contudo, acredita-se que a injeção intravítrea de dispase associada à vitrectomia facilite a separação do vítreo posterior, e, conseqüentemente, reduza a incidência de

complicações intra-operatórias durante a dissecação da hialóide posterior, diminuindo os efeitos colaterais relacionados à inespecificidade de ação apresentada por outros agentes na vitrectomia farmacológica.

Em nossa pesquisa, os suínos vivos foram o modelo experimental utilizado, devido à similaridade com a anatomia ocular humana e a forte aderência do vítreo à retina (OLIVEIRA et al., 2000) (Figura 10).



**Figura 10. Corte coronal de globo ocular enucleado fixado em glutaraldeído 2%, de suíno *Sus scrofa*. Estrutura ocular de dimensões semelhantes ao olho humano**

O propósito deste estudo visa à avaliação da eficácia e toxicidade da injeção intravítrea de dispase no auxílio à vitrectomia na separação do córtex vítreo em suínos vivos. Portanto, esperamos que as informações obtidas em nossa pesquisa auxiliem no desenvolvimento de protocolos experimentais de vitrectomia farmacológica, e contribuam para possível aplicabilidade em futuros estudos clínicos que visem diminuir o índice de complicações relacionados com a dissecação vítrea.

### 3 OBJETIVOS

O estudo baseia-se na avaliação dos seguintes aspectos:

1. Determinar a eficácia na indução de descolamento do vítreo posterior entre os grupos de suínos submetidos à vitrectomia via pars plana associadas à injeção intravítrea de 50 $\mu$ g de dispase e, no grupo controle, injeção de solução salina.
2. Estabelecer a toxicidade da injeção intravítrea de 50 $\mu$ g de dispase, em conjunto à vitrectomia via pars plana, na indução mecânica do descolamento do vítreo posterior em suínos.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

Estudo experimental, duplo-cego e randomizado, preenchendo os critérios e exigências estabelecidos pela resolução de tratamento animal da *Association for Research in Vision and Ophthalmology*.

### 4.1 Preparação da dispase

A dispase (Gibco, Grand Island, New York) foi preparada em condições estéreis no dia anterior ao procedimento cirúrgico, pela diluição em solução salina tamponada com fosfato – *phosphate buffered saline* (PBS) – na concentração de 50µg/0,05mL (pH= 7,4). Foi filtrada e estocada em -5°C (1mg = 0,77 UI).

### 4.2 Animais

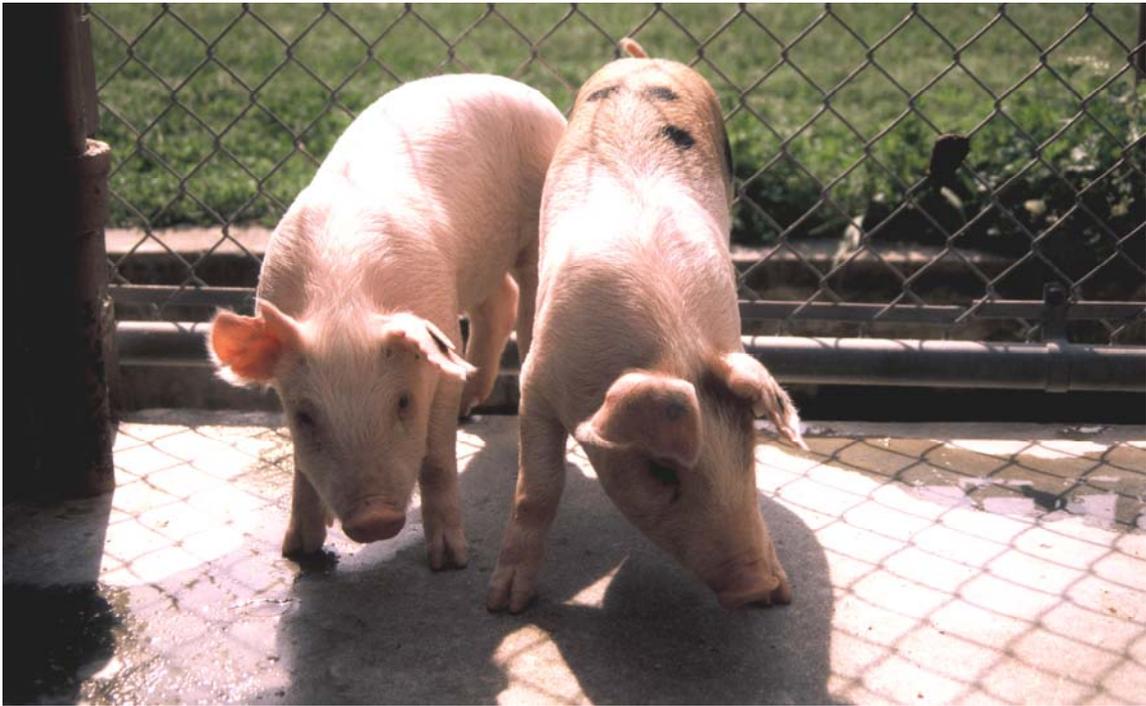
Vinte e quatro suínos da espécie *Sus scrofa*, com idades variando de 3 a 7 semanas, foram randomizados em dois grupos (Figura 11).

*Grupo 1:* Vitrectomia associada com injeção intravítrea de dispase; e

*Grupo 2:* Vitrectomia associada com injeção intravítrea de PBS (controle).

Cada um dos grupos foi constituído de 12 animais, que receberam injeção intravítrea de 50µg (0,05mL) de dispase ou 0,05mL de PBS em um olho, logo após core vitrectomia via

pars plana, seguida por um período de espera de 15 minutos, e, consecutivamente, aplicada a aspiração ativa com o vitreófago sobre o vítreo cortical adjacente à papila do nervo óptico.



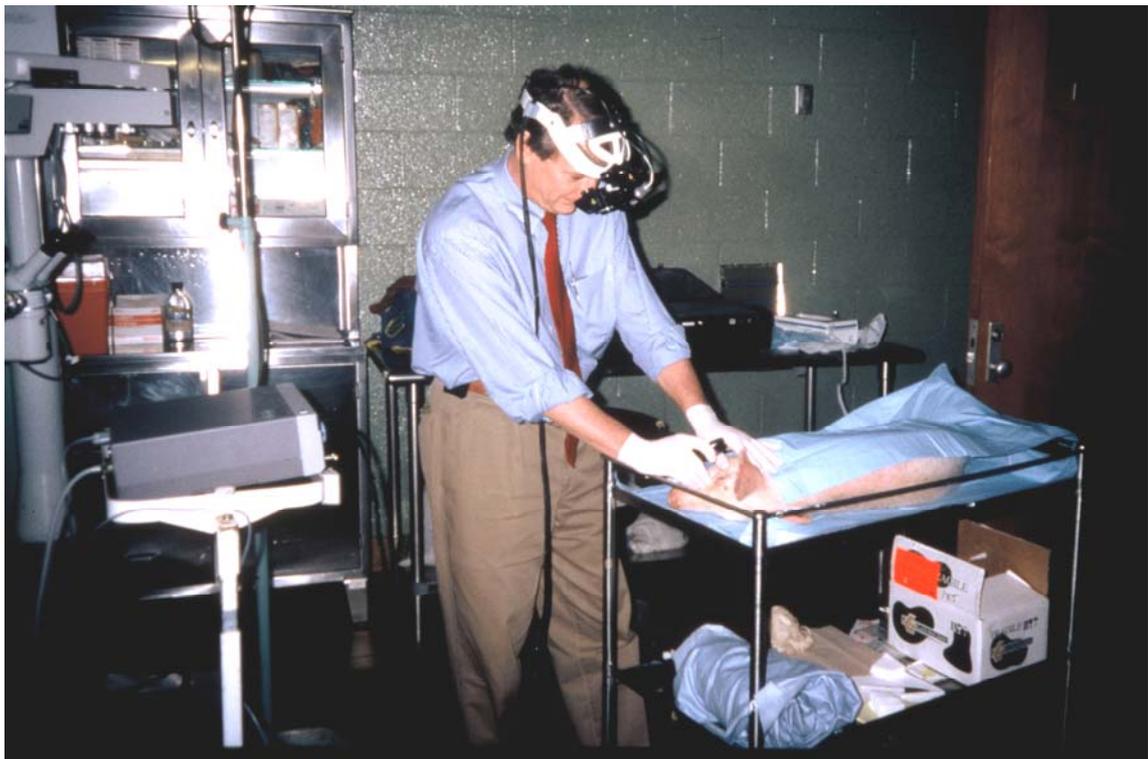
**Figura 11.** Suínos da espécie *Sus scrofa* de 7 semanas

### 4.3 Procedimento

A anestesia geral em suínos foi induzida pela injeção intramuscular (IM) de 2mL a 3mL da combinação de xilazina (TranquiVed, *Vedco, Inc, MO, USA* – 100mg/mL) e cetamina (KetaVed, *Phoenix Scientific, Inc., MO, USA* – 100mg/mL). A injeção IM de 1mL de cetamina foi utilizada na necessidade de complementação anestésica durante o procedimento. Para dilatação pupilar, foram empregados ciclopentolato 1% (AK – Pentolate 1%, *Akron, Inc.,*

LA, USA) e fenilefrina 10% (Ak-dilate, Akron, Inc., LA, USA). Anteriormente à preparação do campo cirúrgico estéril, o saco conjuntival foi irrigado com polvidine 5%.

Todos os animais foram inicialmente examinados com oftalmoscópio indireto para exclusão de eventual presença de anormalidades vítreo-retinianas (Figura 12). A membrana nictante foi removida para facilitar o acesso dos instrumentos cirúrgicos à esclerotomia. Três esclerotomias foram criadas a 2mm do limbo cirúrgico, e o sistema de cânulas esclerais para vitrectomia via pars plana (Grieshaber /19 gauge) foi implantado para melhor acesso, controle de fluxo e proteção da base vítrea. Core vitrectomia com lente de contato de 30 graus foi realizada utilizando-se unidade de vitrectomia, Daisy (Storz), para remover o gel vítreo axial.



**Figura 12. Ilustração da realização da oftalmoscopia indireta**

As esclerotomias foram temporariamente ocluídas, a infusão intravítrea de ringer lactato interrompida e os olhos randomizados para injeção intravítrea via pars plana de 0,05mL de dispase (50 $\mu$ g) ou PBS. Os cirurgiões desconheciam a solução a ser injetada. Após a injeção intravítrea, a oftalmoscopia indireta foi efetuada para identificação de eventual hemorragia ou trauma relacionado ao contato da agulha. Após 15 minutos de espera, a aspiração ativa (fixada em 100mmHg) com a ponta do vitreófago foi aplicada na borda da papila do nervo óptico com o objetivo de indução mecânica do descolamento da hialóide posterior (Figura 13).



**Figura 13. Ilustração do campo cirúrgico durante a realização da vitrectomia via pars plana**

#### 4.4 Classificação do descolamento do vítreo posterior (DVP)

Baseado em observação intra-operatória e principalmente durante a aspiração ativa do córtex vítreo, o descolamento do vítreo posterior (DVP) foi classificado em:

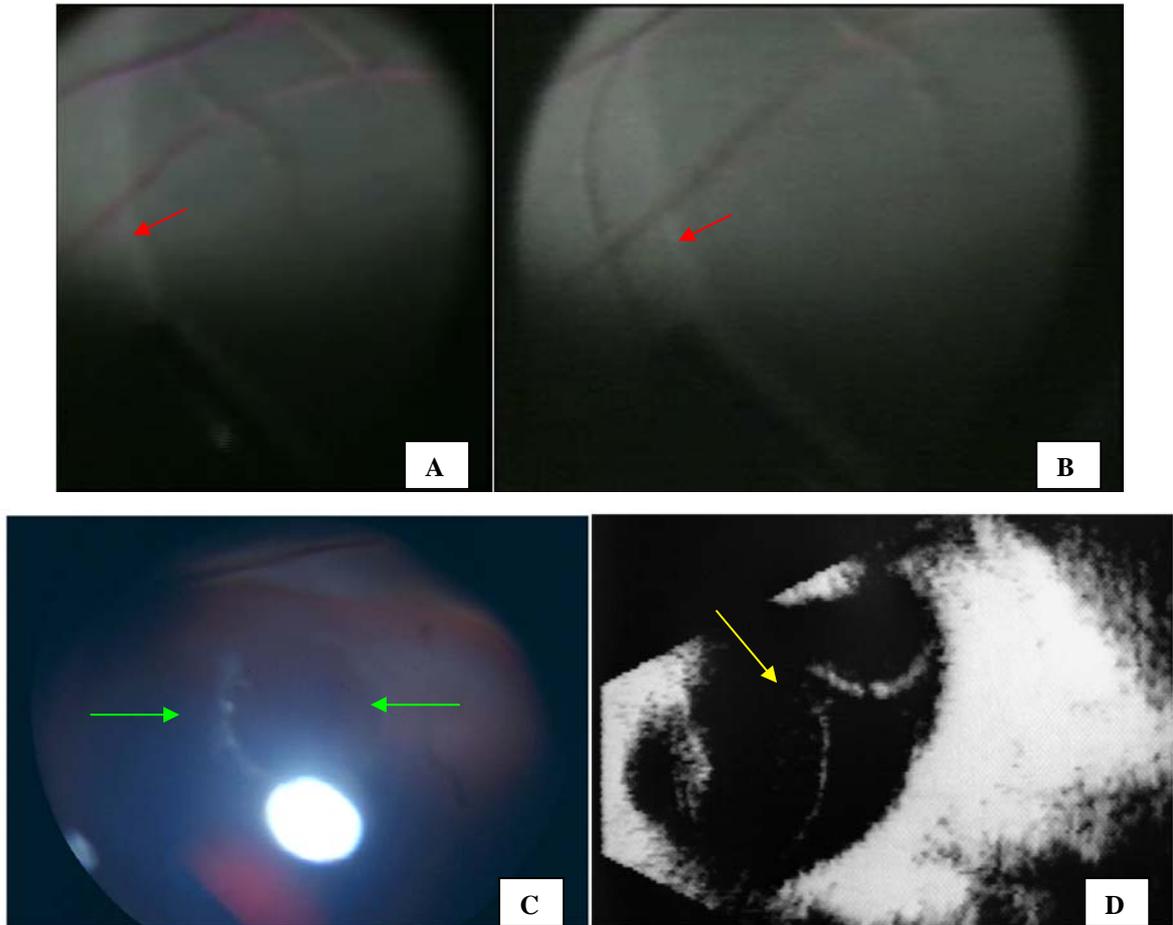
**DVP total:** Identificação de uma linha contínua e de forma crescente na superfície retiniana que se move anteriormente a partir da papila do nervo óptico nos quatro quadrantes, e/ou quando obtida a separação do anel de Weiss (Figura 14).

**DVP parcial:** Identificação de uma linha contínua e de forma crescente em menos de quatro quadrantes, observando-se uma persistente tração vítrea durante a aspiração ativa sobre as correspondentes áreas da superfície retiniana onde não se evidenciou a citada linha.

**DVP ausente:** Nenhuma linha foi identificada na superfície retiniana em nenhum dos quadrantes, e a persistente tração vítrea durante a aspiração foi observada em toda a extensão da superfície retiniana.

**DVP indeterminado:** Identificação impossível de sinais sugestivos de descolamento vítreo ou qualquer evidência de tração vítrea durante a aspiração ativa.

Nos olhos onde os achados clínicos, durante a tentativa de separação do vítreo posterior, foram de difícil interpretação (DVP indeterminado), a microscopia eletrônica de varredura foi realizada nos 4 quadrantes da calota ocular, para determinar a extensão do descolamento do vítreo, sendo, subseqüentemente, reclassificados em um dos outros três grupos definidos – **DVP total, parcial ou ausente**. A microscopia eletrônica de varredura também foi aplicada em seletos olhos para confirmação dos achados clínicos evidenciados durante o procedimento cirúrgico.



**Figura 14.** Descolamento total do vítreo posterior após injeção de dispase e vitrectomia em suíno. A e B. Identificação de linha contínua e de forma crescente na superfície retiniana que se move anteriormente a partir da papila do nervo óptico em direção à periferia, correspondente à separação da hialóide posterior (seta vermelha). Retinografia (C) evidenciando o descolamento da hialóide posterior mediante a presença do anel de Weiss (seta verde) em porção média da cavidade vítrea, sendo este confirmado com ultrassonografia (D) pós-operatória (seta amarela)

#### 4.5 Avaliação pós-operatória

No grupo 1 (dispase), os animais foram acompanhados no pós-operatório por 1, 4 e 8 semanas (12 por 1 semana, 9 por 4 semanas e 5 por 8 semanas). No grupo 2 (controle), 4 dos 12 animais foram avaliados durante os mesmos períodos do grupo 1 (4 por 1 semana, 2 por 4 semanas e 1 por 8 semanas), e os outros animais foram avaliados apenas para o estudo de

eficácia, tendo sido efetuada a eutanásia imediatamente após a cirurgia. A avaliação clínica consistiu em biomicroscopia e oftalmoscopia indireta (em 1, 4 e 8 semanas), eletroretinografia (em 4 e 8 semanas) e exame histopatológico da retina por microscopia de luz e eletrônica de varredura e/ou transmissão da retina e interface vítreo-retiniana foram realizados em olhos selecionados (Tabela 1 e 2).

**Tabela 1 - Grupo dispase, seguimento pós-operatório**

Suínos	PO imediato	Pós-operatório			MV	MT	ML
		1ª sem	4ª sem	8ª sem			
1	Todos os animais foram mantidos vivos para acompanhamento pós-operatório	■	■	■ ■	-	+	+
2		■	■	■ ■ ■	-	+	+
3		■	■	■ ■ ■	+	-	+
4		■	■ ■	■ ■ ■	+	-	-
5		■	■ ■ ■	■ ■ ■	+	+	+
6		■	■	■ ■ ■	+	-	-
7		■ ■	■	■ ■ ■	+	-	+
8		■	■ ■ ■	■ ■ ■	+	-	-
9		■	■	■ ■ ■	-	+	-
10		■ ■	■	■ ■ ■	+	-	-
11		■	■ ■	■ ■ ■	+	+	+
12		■	■ ■ ■	■ ■ ■	-	-	-

PO= pós-operatório; sem= semana; ■ = Eletroretinografia; ■ = Exame clínico; ■ = Eutanásia; MV= Microscopia eletrônica de varredura; MT= Microscopia de transmissão; ML= Microscopia de luz; (+) = realizado; (-) = não realizado

**Tabela 2 - Grupo controle, seguimento pós-operatório**

Suínos	PO imediato	Pós-operatório			MV	MT	ML
		1ª sem	4ª sem	8ª sem			
1	■	■	■	■ ■ ■	+	-	+
2	■	■	■	■ ■ ■	-	+	+
3	■	■	■ ■ ■	■ ■ ■	-	+	-
4	■	■	■ ■ ■	■ ■ ■	+	-	+
5	■	■	■ ■ ■	■ ■ ■	-	-	-
6	■	■ ■	■ ■ ■	■ ■ ■	-	+	-
7	■	■	■ ■ ■	■ ■ ■	+	-	+
8	■	■	■ ■ ■	■ ■ ■	-	-	+
9	■	■	■ ■ ■	■ ■ ■	-	-	-
10	■	■	■ ■ ■	■ ■ ■	+	-	+
11	■	■	■ ■ ■	■ ■ ■	-	-	-
12	■	■	■ ■ ■	■ ■ ■	-	-	-

PO= pós-operatório; sem= semana; ■ = Eletroretinografia; ■ = Exame clínico; ■ = Eutanásia; MV= Microscopia eletrônica de varredura; MT= Microscopia de transmissão; ML= Microscopia de luz; (+) = realizado; (-) = não realizado

#### 4.6 Eletrofisiologia

Antes da realização da eletroretinografia, os animais foram adaptados ao escuro por uma hora. Sob anestesia geral, o exame foi realizado usando o UTAS-2000 (LKC Technologies, Gaithersburg, MD). *Full-field* eletroretinograma foi realizado nos dois olhos de cada animal, usando-se um sistema computadorizado com eletrodos de lentes de contato Jet. Duas respostas eletroretinográficas foram analisadas: resposta escotópica *dim-blue* (média de 40 estímulos) e resposta fotópica '1Hz *single flash*' (média de 20 estímulos) (PETTERS et al., 1997) (Figura 15).



**Figura 15.** Ilustração da realização do eletroretinograma após o tratamento cirúrgico

No grupo dispase, 4 animais foram avaliados na 4ª semana pós-operatória e outros 4 animais na 8ª semana pós-operatória. Já no grupo controle, 1 animal foi avaliado na 4ª semana, enquanto outros 2 foram avaliados na 8ª semana pós-operatória (ver Tabela 1 e 2).

#### **4.7 Avaliação clínica**

Após o eletroretinograma, cada animal foi clinicamente examinado por biomicroscopia e oftalmoscopia indireta. Câmera Genesis (Kowa) foi usada para fotos do seguimento anterior e posterior de cada olho.

Baseada na classificação usada no *Endophthalmitis Vitrectomy Study* (1995), a opacidade de meio foi classificada como a seguir:

*Grau 0*= opacidade de meio ausente;

*Grau 1*= opacidade de meio presentes, mas com vasos de segunda ordem visíveis;

*Grau 2*= impossibilidade na visualização dos vasos de segunda ordem, mas com alguns vasos retinianos visíveis;

*Grau 3*= impossibilidade na visualização dos vasos retinianos, mas com reflexo vermelho presente;

*Grau 4*= reflexo vermelho ausente.

#### **4.8 Exame histológico**

A eutanásia foi realizada com injeção intracardíaca de sódio pentobarbital. Após enucleação, os olhos foram submetidos à imediata penetração por lâmina no pólo superior subjacente na região da via pars plana, para assegurar a penetração da solução de fixação. Os

olhos permaneceram imersos em solução de paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2,5% (0,1M *phosphate buffer* e pH 7,4) por, no mínimo, 24 horas à 4°C.

Para microscopia de luz, o globo foi embebido em parafina, realizadas secções horizontais de 5µm de espessura, e, consecutivamente, processados para hematoxilina-eosina.

Para microscopia eletrônica de varredura, os olhos foram divididos em 4 quadrantes onde, através de um trépano os segmentos retinianos foram obtidos extendendo-se entre as porções do pólo posterior até a região equatorial. Os segmentos foram desidratados em etanol, submetidos ao processo de secagem em dióxido de carbono líquido até o ponto crítico, cobertos em ouro e fotografados, usando microscópio de varredura JSM 6400. Para microscopia eletrônica de transmissão, o tecido foi desidratado em séries de etanol, seguido por óxido de propileno, infiltrado, e embebido no meio de Spurr. As secções (70nm) foram processadas usando-se lâmina de diamante DDK no micrótomo Reichert Ultracut S, montado em compartimento de rede (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). As secções foram constratadas por 15 minutos em  $KMnO_4$  e por 5 minutos em solução de Sato.

#### **4.9 Análise estatística**

A incidência de descolamento do vítreo posterior foi analisada usando o Exact 2-sided Wilcoxon e teste Mann-Whitney usando Statxact-4 for Windows (CYTEL Software Corp., Cambridge, MA). O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5 RESULTADOS

Baseado nos achados clínico-cirúrgicos durante o ato operatório, o descolamento de vítreo foi classificado como a seguir:

No grupo em que se utilizou dispase (n= 12):

- 7 olhos apresentaram descolamento total do vítreo posterior;
- Nenhum dos olhos apresentou descolamento parcial do vítreo posterior;
- Nenhum dos olhos apresentou ausência de descolamento de vítreo posterior;
- Em 5 olhos não foi possível a graduação do descolamento de vítreo posterior.

No grupo em que se utilizou solução salina (n= 12):

- Nenhum dos olhos apresentou descolamento total do vítreo posterior;
- 5 olhos apresentaram descolamento parcial do vítreo posterior;
- 3 olhos apresentaram ausência de qualquer grau de descolamento do vítreo;
- Em 4 olhos não foi possível a graduação do descolamento do vítreo durante o procedimento cirúrgico.

Portanto, durante o procedimento cirúrgico, em um total de 9 olhos (5 olhos do grupo da dispase e 4 olhos do grupo da solução salina), não foi possível determinar a extensão do descolamento do vítreo, os quais foram submetidos ao processamento para análise com microscopia eletrônica de varredura com o objetivo de determinar o estado de diferentes quadrantes da superfície retiniana.

Após a análise com microscopia eletrônica de varredura, os resultados foram os seguintes (Tabela 3).

**Tabela 3 - Classificação do descolamento do vítreo posterior (DVP) dos grupos dispase (OD) e controle (OE) com e sem o auxílio da microscopia eletrônica de varredura (MV)**

	Classificação cirúrgica		Classificação cirúrgica + MV	
	OD (n=12)	OE (n= 12)	OD (n= 12)	OE (n= 12)
DVP total	7	0	7	2
DVP parcial	0	5	5	7
DVP ausente	0	3	0	3
Indeterminado	5	4	-	-

Grupo dispase:

- 7 de 12 (58,3%) olhos apresentaram descolamento total de vítreo posterior;
- 5 de 12 (41,7%) olhos apresentaram descolamento parcial de vítreo posterior;

Grupo solução salina:

- 2 de 12 (16,7%) olhos apresentaram descolamento total de vítreo posterior;
- 7 de 12 (58,3%) olhos apresentaram descolamento parcial de vítreo posterior;
- Em 3 de 12 (25,0%) olhos não foi possível induzir qualquer grau de descolamento do vítreo posterior.

A análise estatística mostrou significância no aumento da incidência de descolamento de vítreo posterior no grupo dispase comparado com o grupo solução salina ( $p= 0,029$ ).

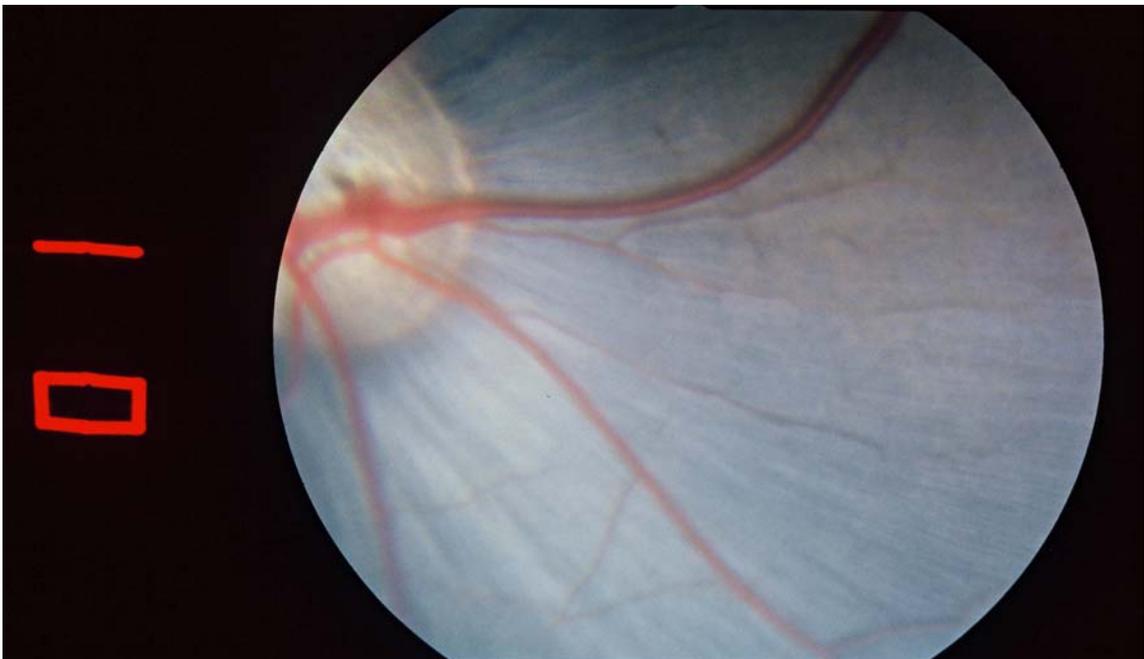
Não foram evidenciadas complicações intra-operatórias, como hemorragias ou roturas, durante a tentativa de descolamento da hialóide posterior.

Durante o exame clínico pós-operatório, o 'grupo dispase' apresentou os seguintes achados (Figura 16 e Tabela 4):

#### **1ª semana de pós-operatório**

- 7 de 12 olhos sem qualquer opacidade de meio (G0) sem alterações retinianas, 2 de 12 olhos apresentaram opacidade vítrea leve (G1), 1 de 12 olhos apresentou opacidade moderada (G2), e 2 olhos com reflexo vermelho presente (G3).

- 2 dos 5 olhos com algum grau de opacidade vítrea com 1 semana de pós-operatório; foi realizada eutanásia dos animais (G1 e G2), e ambos apresentaram histologia retiniana normal.
- Outros 2 olhos com opacidade vítrea, na 1ª semana de pós-operatório, apresentaram total reabsorção de opacidade na 4ª semana de pós-operatório.
- No seguimento de 4 semanas após cirurgia, 1 olho apresentou residual hemorrágico em cavidade vítrea e evidência de embainhamento de segmento vascular em um quadrante.



**Figura 16. Retinografia de suíno na quarta semana pós-operatória (grupo dispase). Apresenta estruturas oculares preservadas, meio totalmente transparente e sem evidência de efeitos colaterais intra-oculares**

**Tabela 4 - Resultado da análise segundo o grau de opacidade feita nos animais durante a 1ª, 4ª e 8ª semana de pós-operatório no grupo dispase**

Suínos	Hemorragia (Esclerotomias)	Pós-operatório		
		1ª semana	4ª semana	8ª semana
1	+	G0	G0	G0 ■
2	-	G3	G0	G0, DOC ■
3	-	G0	G0	G0, DOC ■
4	-	G0	G0 ■	
5	-	G0	G0 ■	
6	-	G0	G0	G0 ■
7	-	G1, Cat SCP ■		
8	-	G0	G0 ■	
9	-	G0	G0	G0 ■
10	+	G2 ■		
11	+	G3, Cat SCP	G1, alt.vascular ■	
12	-	G1	G0 ■	

(+)= com indícios; (-)= sem indícios; ■ = eutanásia. Grau de opacidade de meio no pós-operatório: Grau 0 = ausente; Grau 1 = presente, mas com vasos de segunda ordem visíveis; Grau 2 = impossibilidade na visualização dos vasos de segunda ordem, mas com alguns vasos retinianos visíveis; Grau 3 = impossibilidade na visualização dos vasos retinianos, mas com reflexo vermelho presente; Grau 4 = reflexo vermelho ausente. Cat SCP = catarata subcapsular posterior; alt.= alteração; DOC = discreta opacidade corneana (*haze leve*)

Por sua vez, o exame clínico pós-operatório do ‘grupo solução salina’ apresentou os seguintes achados (Tabela 5):

#### **1ª semana de pós-operatório**

- 4 olhos foram examinados; 2 deles apresentaram ausência de opacidade vítrea (G0), e outros 2 apresentaram opacidade vítrea leve (G1).
- Houve eutanásia de 1 suíno, que apresentou opacidade vítrea leve (G1) na 1ª semana pós-operatória, e, após eutanásia, verificou-se histologia retiniana normal.
- Na 4ª semana pós-operatória, 3 dos 4 animais foram examinados clinicamente e apresentaram ausência de opacidade vítrea. Concomitantemente, houve eutanásia dos 3 suínos, e verificou-se histologia retiniana preservada.

**Tabela 5 - Resultado da análise segundo o grau de opacidade feita nos animais durante a 1ª, 4ª e 8ª semana de pós-operatório no grupo controle**

Suínos	Hemorragia (Esclerotomias)	Pós-operatório		
		1ª semana	4ª semana	8ª semana
1	-	G0	G0	G0, Cat SCP ■
2	-	G0	G0	G0 ■
3	-	G1	G0 ■	
4	(■ POI)			
5	(■ POI)			
6	+	G1 ■		
7	(■ POI)			
8	(■ POI)			
9	(■ POI)			
10	(■ POI)			
11	(■ POI)			
12	(■ POI)			

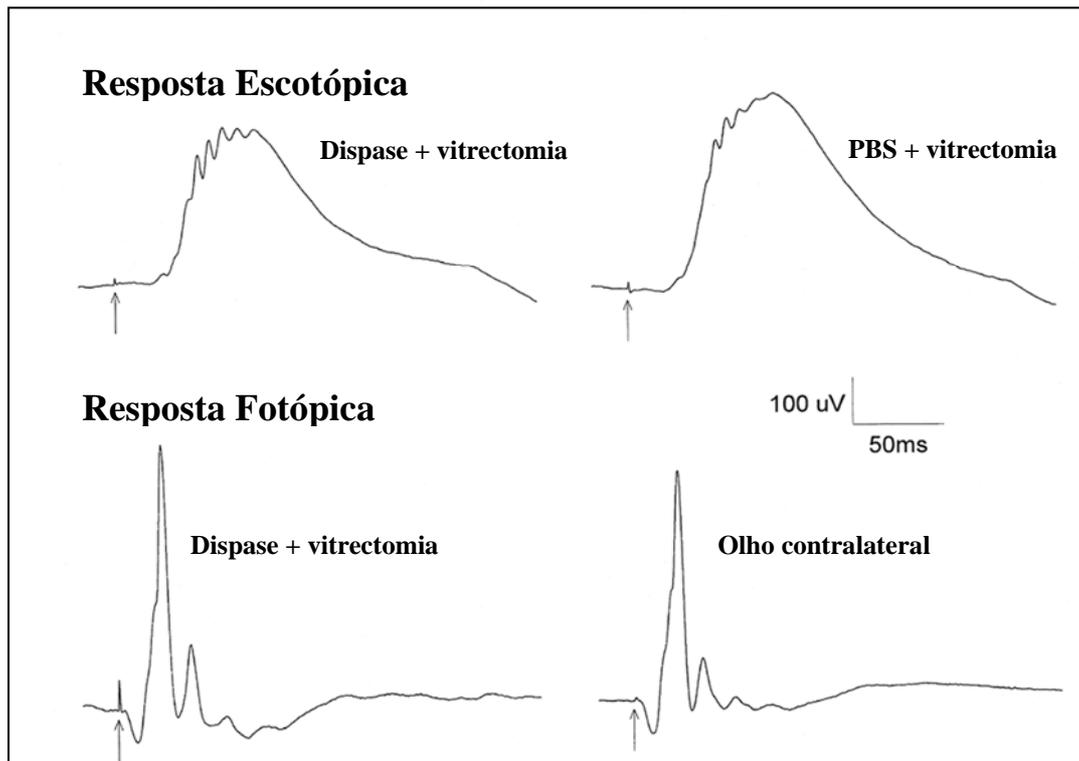
(+)= com indícios; (-)= sem indícios; ■ = eutanásia; (■ POI)= eutanásia no pós-operatório imediato. Grau de opacidade de meio no pós-operatório: Grau 0 = ausente; Grau 1 = presente, mas com vasos de segunda ordem visíveis; Grau 2 = impossibilidade na visualização dos vasos de segunda ordem, mas com alguns vasos retinianos visíveis; Grau 3 = impossibilidade na visualização dos vasos retinianos, mas com reflexo vermelho presente; Grau 4 = reflexo vermelho ausente. Cat SCP = catarata subcapsular posterior

No ‘grupo dispase’, o desenvolvimento de catarata ocorreu em 2 dos 12 animais, que foram diagnosticados na 1ª semana de pós-operatório; e no ‘grupo solução salina’, em 1 dos 4 animais, foi diagnosticado na 8ª semana de pós-operatório. Quanto à opacidade do cristalino, apresentaram padrão subcapsular posterior, o que não impediu a observação de detalhes no segmento posterior.

No ‘grupo dispase’, 2 olhos apresentaram opacidade subepitelial corneana leve e difusa, enquanto, no ‘grupo solução salina’, não foi encontrado achado clínico semelhante. No entanto, tais achados foram atribuídos à remoção da membrana nictante (membrana ocular externa responsável pela lubrificação, oclusão e umidificação da superfície ocular), o que, possivelmente, ocasionou o quadro de ceratopatia. Tais achados foram anteriormente evidenciados em outro estudo realizado pelo nosso grupo (observação pessoal).

A análise eletroretinográfica não apresentou diferença entre os padrões dos grupos ‘dispase’ e ‘solução salina’ ou entre os grupos de olhos operados ou contralaterais (não-

operados). As amplitudes dos estímulos escotópicos ou fotópicos da onda B, tanto do grupo ‘dispase’ quanto ‘solução salina’, mostraram-se simétricas aos seus correspondentes olhos contralaterais (não-operados) (Figura 17; Tabela 6 e Figura 18; Tabela 7 e Figura 19; Tabela 8 e Figura 20; Tabela 9 e Figura 21).

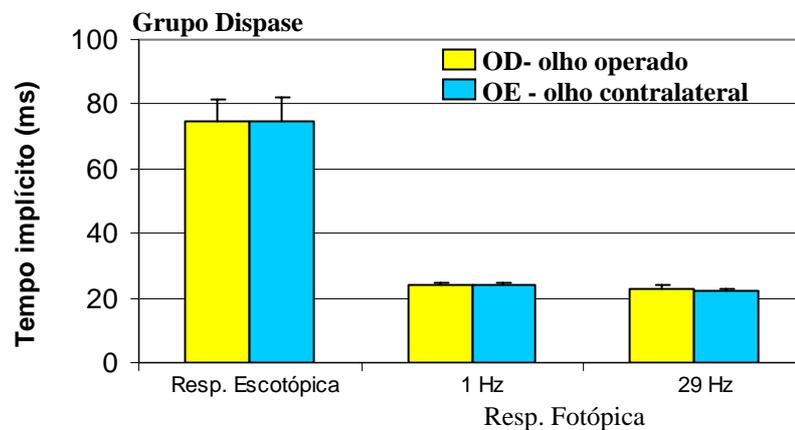


*PBS= Phosphate buffered saline*

**Figura 17. Exemplicação de resposta eletroretinográfica de suíno. Respostas escotópicas (acima) em dois diferentes animais (grupo dispase e controle) e respostas fotópicas (abaixo) entre os olhos operado e controle do mesmo animal, comparativamente simétricos na 8ª semana pós-operatória**

**Tabela 6 - Resultados individuais de 8 animais, média e desvio-padrão (dp) da análise eletroretinográfica, segundo o tempo implícito para resposta escotópica, e fotópica de 1Hz e 29Hz no grupo dispase olho operado (OD) e olho contralateral (OE)**

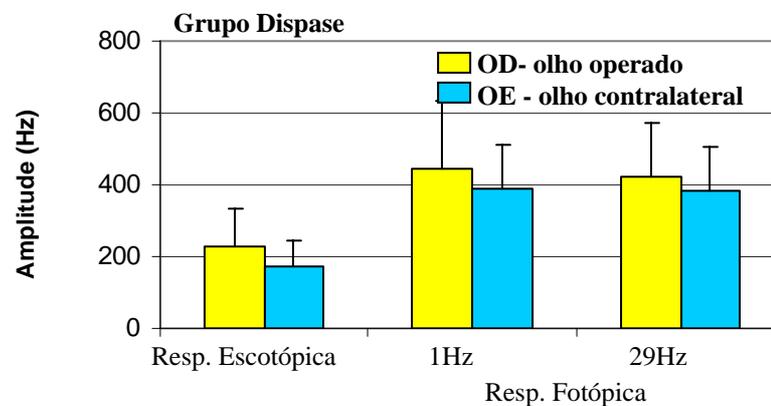
n	Escotópica		Fotópica			
			Resposta com 20 estímulos (fotópica 1Hz)		Resposta com 40 estímulos (fotópica 29Hz)	
	OD	OE	OD	OE	OD	OE
1	70,5	68,5	24,0	23,5	23,2	22,4
2	80,5	77,5	25,0	24,0	23,2	22,4
3	76,0	76,5	23,5	23,0	22,8	21,8
4	73,5	66,0	25,0	25,0	21,5	22,5
5	73,5	80,5	23,5	23,5	23,8	22,3
6	74,0	75,0	24,5	24,0	23,8	22,5
7	86,0	88,5	24,0	23,5	23,7	22,7
8	63,0	63,0	24,0	23,5	21,9	20,9
média	74,63	74,44	24,19	23,75	22,99	22,19
dp	6,6	8,0	0,6	0,6	0,9	0,6



**Figura 18. Comparação da média e desvio-padrão do grupo dispase da análise eletroretinográfica para a resposta escotópica e resposta fotópica de 1Hz e 29Hz, segundo o tempo implícito, no grupo de olho operado (OD) e olho contralateral (OE)**

**Tabela 7 - Resultados individuais de 8 animais, média e desvio-padrão (dp) da análise eletroretinográfica segundo a amplitude da onda B, para resposta escotópica e fotópica de 1Hz e 29Hz no grupo dispase olho operado (OD) e olho contralateral (OE)**

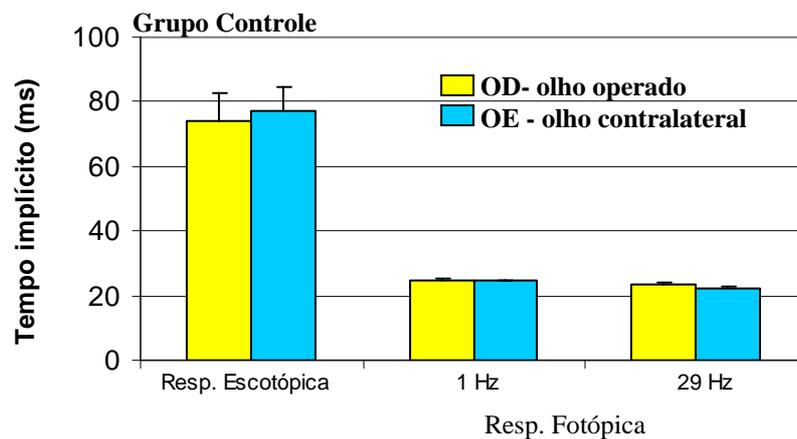
n	Escotópica		Fotópica			
			Resposta com 20 estímulos (fotópica 1Hz)		Resposta com 40 estímulos (fotópica 29Hz)	
	OD	OE	OD	OE	OD	OE
1	377,0	224,0	707,0	567,0	661,9	543,8
2	293,0	199,0	322,0	374,0	264,0	199,0
3	100,0	103,0	278,0	285,0	343,1	336,0
4	127,0	62,0	259,0	219,0	261,0	277,0
5	165,0	161,0	428,0	396,0	465,3	445,0
6	331,0	298,0	589,0	526,0	564,5	546,8
7	284,0	179,0	676,0	443,0	513,8	308,2
8	165,0	170,0	288,0	308,0	318,2	393,2
média	230,25	174,50	443,38	389,75	423,98	381,13
dp	103,3	72,0	187,2	119,5	149,3	125,1



**Figura 19. Comparação da média e desvio-padrão do grupo dispase da análise eletroretinográfica para a resposta escotópica e resposta fotópica, segundo a amplitude da onda B, de 1Hz e 29Hz no olho operado (OD) e olho contralateral (OE)**

**Tabela 8 - Resultados individuais de 3 animais, média e desvio-padrão (dp) da análise eletroretinográfica segundo o tempo implícito, para resposta escotópica e fotópica de 1Hz e 29Hz no grupo controle, olho operado (OD) e olho contralateral (OE)**

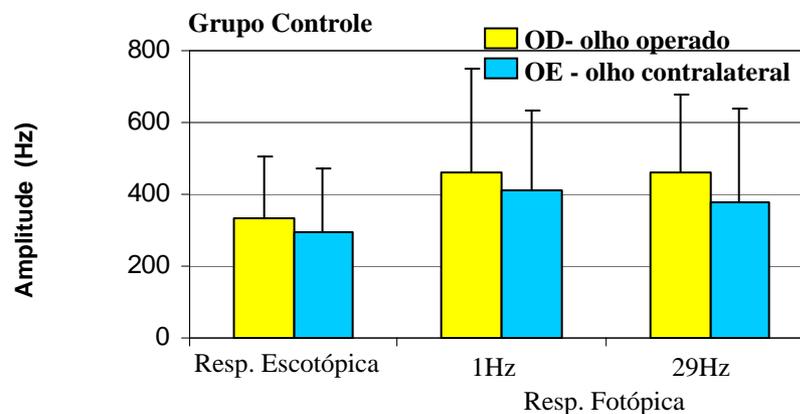
n	Escotópica		Fotópica			
			Resposta com 20 estímulos (fotópica 1Hz)		Resposta com 40 estímulos (fotópica 29Hz)	
	OD	OE	OD	OE	OD	OE
1	81,5	79,0	24,5	24,5	23,9	23,2
2	65,0	69,5	25,0	25,0	22,1	22,1
3	76,0	83,5	25,0	24,0	23,7	22,3
média	74,17	77,33	24,83	24,50	23,23	22,53
dp	8,4	7,1	0,29	0,50	0,99	0,59



**Figura 20. Comparação da média e desvio-padrão do grupo controle da análise eletroretinográfica para a resposta escotópica e resposta fotópica de 1Hz e 29Hz, segundo o tempo implícito no olho operado (OD) e olho contralateral (OE)**

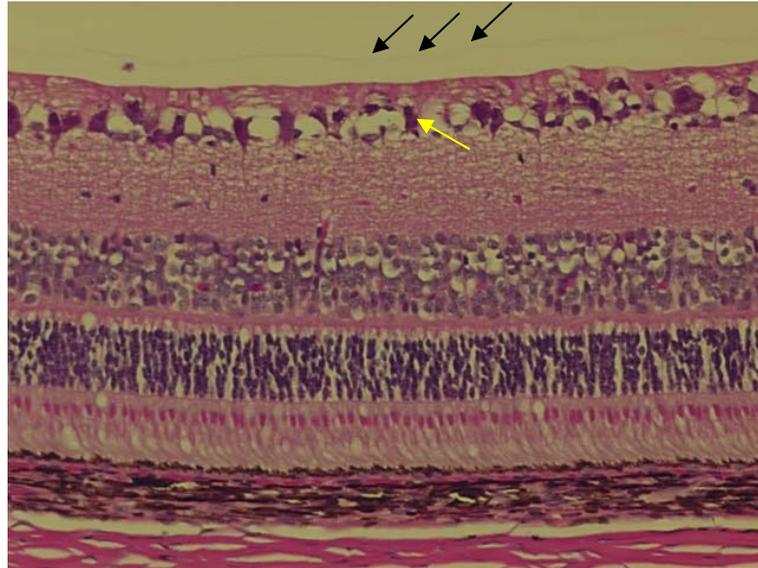
**Tabela 9 - Resultados individuais de 3 animais, média e desvio-padrão (dp) da análise eletroretinográfica segundo a amplitude da onda B, para resposta escotópica e fotópica de 1Hz e 29Hz no grupo controle, olho operado (OD) e olho contralateral (OE)**

n	Escotópica		Fotópica			
			Resposta com 20 estímulos (fotópica 1Hz)		Resposta com 40 estímulos (fotópica 29Hz)	
	OD	OE	OD	OE	OD	OE
1	460,0	453,0	683,0	569,0	679,0	624,0
2	398,0	328,0	563,0	506,0	461,0	402,0
3	134,0	96,0	136,0	158,0	236,0	102,0
média	330,67	292,33	460,67	411,00	458,67	376,00
dp	173,1	181,2	287,5	221,4	221,5	262,0



**Figura 21. Comparação da média e desvio-padrão do grupo controle da análise eletroretinográfica para a resposta escotópica e resposta fotópica de 1Hz e 29Hz, segundo a amplitude da onda B, no olho operado (OD) e olho contralateral (OE)**

As lâminas de microscopia de luz apresentaram-se normais entre os grupos. Um dos olhos do ‘grupo dispase’, que apresentou persistência de opacidade vítrea, evidenciou aglutinação de células inflamatórias sobre a papila do nervo óptico, correspondente ao processo hemorrágico/inflamatório encontrado durante o exame clínico. Não se evidenciaram alterações perivasculares ou da parede vascular, desorganização ou necrose do tecido retiniano (Figura 22 e Tabela 10).



**Figura 22.** Microscopia de luz (hematoxilina-eosina) de retina de suíno mostrando a morfologia de retina neurosensorial e interface vítreo-retiniana. Pós-operatório de vitrectomia (grupo controle), na qual se pode observar a presença de fina camada de colágeno correspondente à presença de hialóide posterior aderida à superfície retiniana (seta preta). Notam-se encolhimento de células ganglionares (seta amarela) correspondentes a artefatos de técnica inerentes à fixação tecidual (40x)

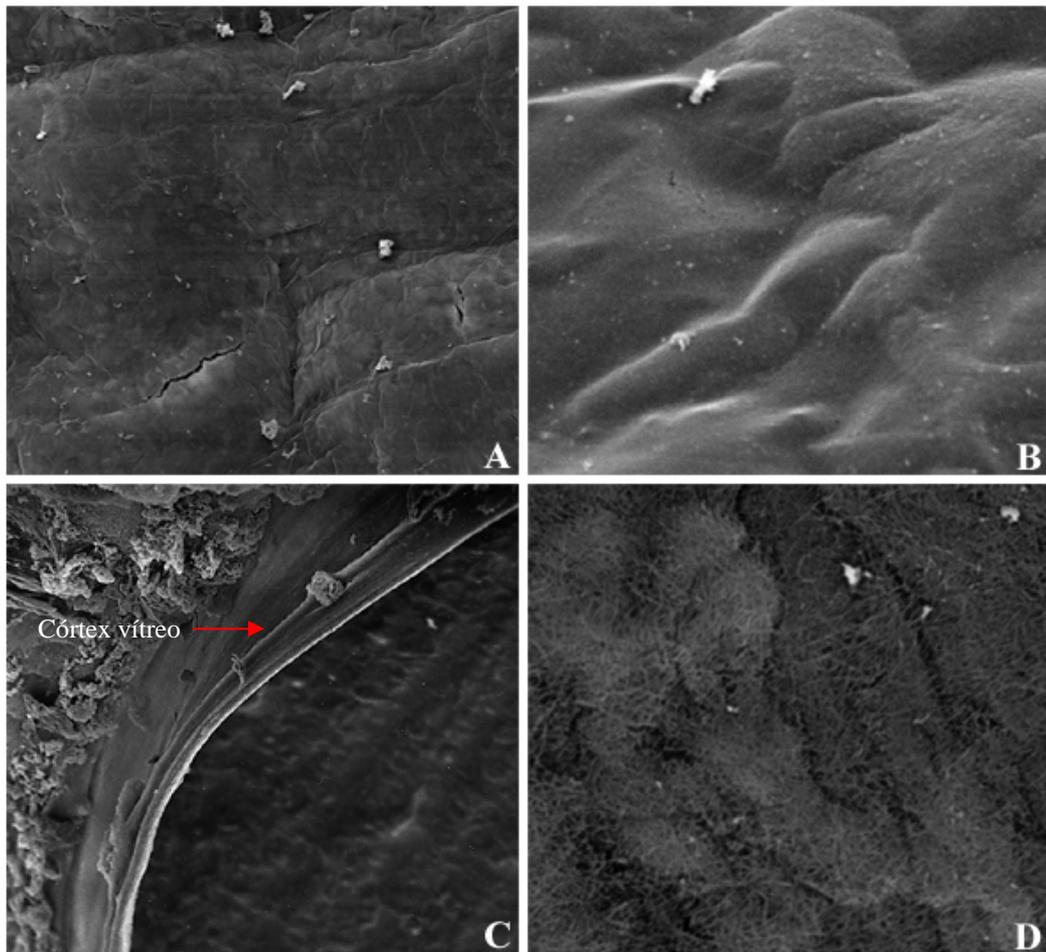
**Tabela 10 - Achados clínicos para determinação do descolamento do vítreo posterior, bem como resultados complementares para análise dos resultados do grupo dispase**

Suínos	CIR (DVP)	MV/CIR (DVP)	Pós-operatório (semanal)			ERG	MV	MT	ML
			1ª sem	4ª sem	8ª sem				
1	Total	Total	G0	G0	G0 ■	+	-	+	+
2	Total	Total	G3	G0	G0 ■	+	-	+	+
3	Indeterminado	Parcial	G0	G0	G0 ■	+	+	-	+
4	Total	Total	G0	G0 ■		+	+	-	-
5	Indeterminado	Parcial	G0	G0 ■		+	+	+	+
6	Total	Total	G0	G0	G0 ■	+	+	-	-
7	Indeterminado	Parcial	G1 ■			-	+	-	+
8	Indeterminado	Parcial	G0	G0 ■		+	+	-	-
9	Total	Total	G0	G0	G0 ■	-	-	+	-
10	Indeterminado	Parcial	G2 ■			-	+	-	-
11	Total	Total	G3	G1 ■		-	+	+	+
12	Total	Total	G1	G0 ■		+	-	-	-

CIR (DVP) = Análise intra-operatória associada à microscopia eletrônica de varredura (descolamento do vítreo posterior); ERG = Eletroretinograma; MV = Microscopia eletrônica de varredura; MT = Microscopia eletrônica de transmissão; ML = Microscopia de luz. (+) = realizado; (-) = não realizado. Grau de opacidade de meio no pós-operatório: Grau 0= ausente; Grau 1= presente, mas com vasos de segunda ordem visíveis; Grau 2= impossibilidade na visualização dos vasos de segunda ordem, mas com alguns vasos retinianos visíveis; Grau 3= impossibilidade na visualização dos vasos retinianos, mas com reflexo vermelho presente; Grau 4= reflexo vermelho ausente; ■ = eutanásia

Em ambos os grupos, em áreas onde foi constatado o descolamento do vítreo intraoperatório, a microscopia eletrônica de varredura evidenciou o contorno das terminações das células de Muller sob a MLI. Portanto, nas áreas correspondentes ao descolamento do vítreo, a superfície interna da retina apresentou-se lisa e ondulada sem evidência de fibrilas colágenas subjacentes. No entanto, em áreas onde o vítreo posterior permaneceu aderido durante o procedimento cirúrgico, houve a persistência de fibrilas colágenas compatíveis com a aderência do vítreo cortical. Os resultados da microscopia eletrônica de varredura também foram utilizados de maneira semelhante para determinar a persistência ou não da aderência do córtex vítreo em quadrantes em que não foi possível a identificação clínica do descolamento do vítreo (Figura 23).

A microscopia eletrônica de transmissão demonstrou raras fibras colágenas adjacentes à membrana limitante interna em áreas de descolamento do vítreo posterior. Em contraste, em áreas onde o vítreo não foi separado da superfície retiniana, foi evidenciada densa malha colágena inserida na membrana limitante adjacente. Adicionalmente, a microscopia de transmissão proporciona a avaliação morfológica da MLI que se apresentou preservada em ambos os grupos. Entretanto, tanto em olhos operados como nos controles contralaterais, foram identificados artefatos (vacúolos) principalmente na camada de fibras nervosas, células ganglionares, segmento interno e externo dos fotorreceptores, atribuídos ao processo de fixação (Figura 24 e Tabela 11).

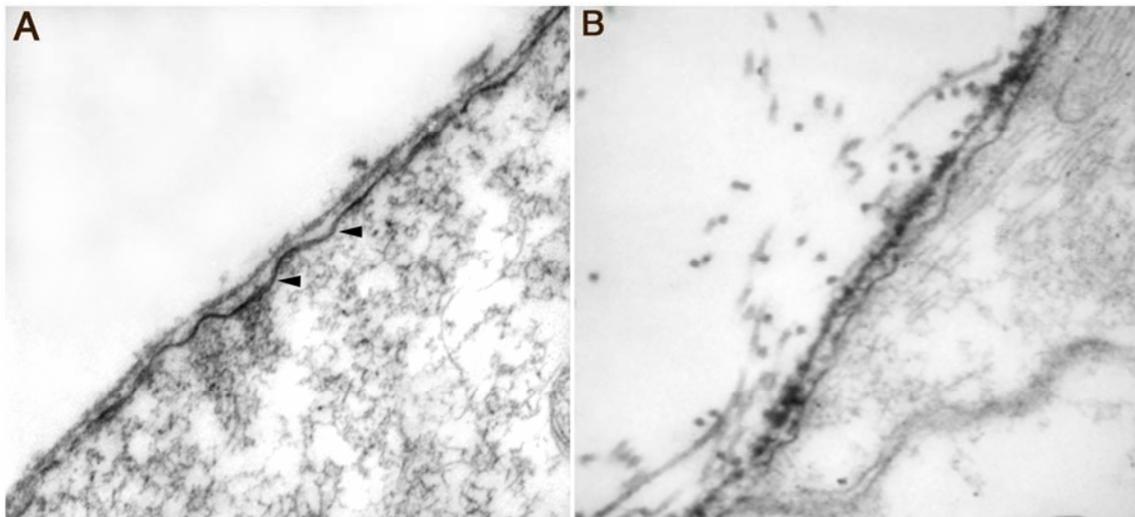


**Figura 23.** A (350x): Microscopia eletrônica de varredura de superfície interna de retina de suíno, evidenciando completo descolamento do vítreo posterior durante a vitrectomia associada com injeção de dispase. B (3.500x): A superfície da retina apresenta-se completamente desprovida de colágeno subjacente, podendo evidenciar superfície lisa e ondulada correspondente à membrana limitante interna (MLI) sobre os pedículos da célula de Muller. C (350x): Microscopia eletrônica de varredura também de superfície interna retiniana evidenciando descolamento parcial do vítreo posterior (seta) em olho submetido à vitrectomia (grupo controle). Nota-se a presença de estrutura hialóide do vítreo posterior aderida à superfície retiniana e superfície adjacente correspondente à exposição da MLI. D (3.500x): região onde o córtex vítreo permaneceu totalmente colado à superfície interna da retina após vitrectomia associado à dispase

**Tabela 11 - Achados clínicos para determinação do descolamento do vítreo posterior, bem como resultados complementares para análise dos resultados do grupo controle**

Suínos	CIR (DVP)	MV/CIR (DVP)	Pós-operatório (semanal)			ERG	MV	MT	ML
			1ª sem	4ª sem	8ª sem				
1	Indeterminado	Parcial	G0	G0	G0 ■	+	+	-	+
2	Ausente	Ausente	G0	G0	G0 ■	+	-	+	+
3	Parcial	Parcial	G1	G0 ■		+	-	+	-
4	Indeterminado	Parcial	(■ POI)			-	+	-	+
5	Parcial	Parcial	(■ POI)			-	-	-	-
6	Ausente	Ausente	G1 ■			-	-	+	-
7	Indeterminado	Total	(■ POI)			-	+	-	+
8	Parcial	Parcial	(■ POI)			-	-	-	+
9	Ausente	Ausente	(■ POI)			-	-	-	-
10	Indeterminado	Total	(■ POI)			-	+	-	+
11	Parcial	Parcial	(■ POI)			-	-	-	-
12	Parcial	Parcial	(■ POI)			-	-	-	-

CIR (DVP) = Análise intra-operatória associada à microscopia de varredura (descolamento do vítreo posterior); ERG = Eletroretinograma; MV = Microscopia eletrônica de varredura; MT = Microscopia eletrônica de transmissão; ML = Microscopia de luz. (+) = realizado; (-) = não realizado. Grau de opacidade de meio no pós-operatório: Grau 0= ausente; Grau 1= presente, mas com vasos de segunda ordem visíveis; Grau 2= impossibilidade na visualização dos vasos de segunda ordem, mas com alguns vasos retinianos visíveis; Grau 3= impossibilidade na visualização dos vasos retinianos, mas com reflexo vermelho presente; Grau 4= reflexo vermelho ausente; ■ = eutanásia; (■ POI) = eutanásia no pós-operatório imediato



**Figura 24. A (12.000x):** Microscopia eletrônica de transmissão de superfície vítreo-retiniana de suíno após indução de descolamento do vítreo posterior durante vitrectomia associado à dispase. Nota-se membrana limitante interna com anatomia preservada e aplicada à superfície retiniana (cabeças de setas). Não há remanescente de fibras colágenas aderidas à retina. **B (12.000x):** Microscopia eletrônica de transmissão de superfície vítreo-retiniana de suíno após vitrectomia associado com injeção salina (grupo controle em que se obteve descolamento parcial de retina). Observa-se segmento onde fibrilas colágenas permanecem aderidas à membrana limitante interna da retina

## 6 DISCUSSÃO

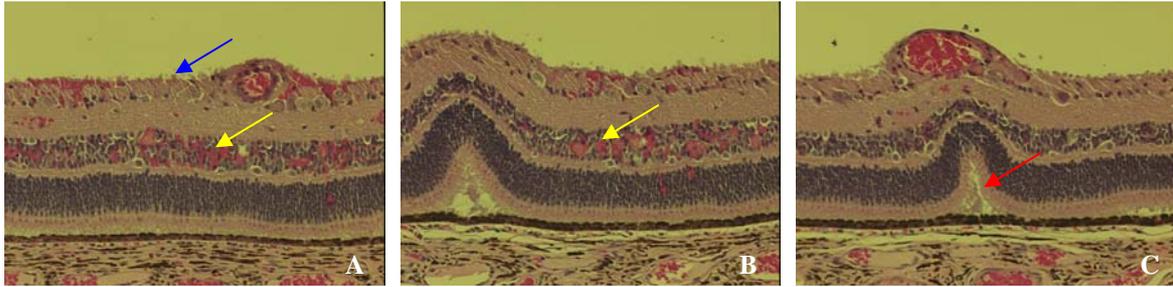
A hialóide posterior de suínos jovens é fortemente aderida à superfície retiniana, reproduzindo, experimentalmente, manobras para dissecação e descolamento do vítreo posterior, principalmente em pacientes pediátricos, nos quais a tração mecânica, através da aspiração ativa com o vitreófago, pode causar hemorragias retinianas, bloqueio do fluxo axoplasmático (esbranquiçamento retiniano durante a tração), e rasgaduras de retina (ver Figura 9).

Em estudo experimental em primatas jovens, em que foi induzido o descolamento mecânico do vítreo posterior durante a vitrectomia via pars plana (RUSSELL; HAGEMAN, 2001), evidenciaram-se, histologicamente, rupturas segmentares ou separação de membrana limitante interna da superfície sensorial da retina. Além disso, alguns animais apresentaram perda de tecido retiniano, acompanhada por avulsão de células ganglionares, camadas plexiformes e nucleares internas, bem como roturas foveais parciais e totais e avulsão de bandas axonais em papila do nervo óptico.

Portanto, tais dados suportam a teoria de que manobras intra-operatórias durante a separação do córtex vítreo podem explicar a perda de campo visual em pós-operatório de cirurgias no tratamento de buracos de mácula. Contudo, durante manobras mecânicas, torna-se necessária a utilização de agentes farmacológicos que exerçam um fator de clivagem e enfraquecimento da junção vítreo-retiniana.

Em contraposto, a maior limitação na incorporação de agentes farmacológicos na cirurgia de vitrectomia são os efeitos colaterais induzidos ao contato com a superfície neurosensorial retiniana. Particularmente à utilização intravítrea da dispase, sabe-se que existem importantes efeitos colaterais previamente descritos (FRENZEL et al., 1998; JORGE

et al., 2003; WANG et al., 2004). Baseados em nossos estudos preliminares, observamos que os efeitos adversos relacionados à dispase intravítrea mostraram-se dependentes de dose e tempo de exposição (detalhados adiante) (Figura 25).



**Figura 25. A, B e C: Microscopia de luz (hematoxilina-eosina), retina de suíno após 24 horas, 500µg de dispase intravítrea (sem vitrectomia em estudo preliminar). Notam-se focos hemorrágicos (seta amarela) em diversas camadas de retina neurosensorial, descontinuidade de membrana limitante interna (seta azul) e contração tecidual envolvendo toda a espessura de retina (seta vermelha) (40x)**

Em ambos os grupos do nosso estudo, após a realização de core vitrectomia, seguido de oclusão de esclerotomias e fechamento de irrigação via pars plana, 50µg/0,05mL de dispase foram injetados em cavidade vítrea, seguindo-se 15 minutos de espera com sistema totalmente fechado. Seguiu-se abertura do sistema de irrigação e lavagem por aspiração ativa de cavidade vítrea e, subsequente, aspiração ativa, em região epipapilar, de membrana hialóide, com objetivo de induzir o descolamento do vítreo posterior.

Essa seqüência durante o procedimento foi idealizada com objetivo de obter a maior exposição possível da enzima com a superfície posterior da retina (core vitrectomia), utilizando-se baixa concentração (50µg) e durante um curto período de exposição (15 minutos), com isso, obtendo um efeito enzimático satisfatório na interface vítreo-retiniana e, ao mesmo tempo, limitando os potenciais efeitos colaterais.

No ‘grupo dispase’, o descolamento total do vítreo posterior foi obtido em 7 dos 12 olhos operados, enquanto no ‘grupo controle salino’ apenas 2 dos 12 olhos obtiveram resultado semelhante. Além disso, no ‘grupo dispase’, não ocorreu ausência de descolamento do vítreo posterior em nenhum dos olhos, enquanto, no ‘grupo controle’, 3 dos 12 olhos apresentaram o vítreo posterior totalmente aplicados (isto é, houve ausência de descolamento), sendo que os outros 9 olhos apresentaram apenas descolamento parcial do vítreo posterior.

Após a revelação do estudo (procedimento mascarado), a análise de anotações técnicas intra-operatórias mostrou que nos olhos onde a dispase foi utilizada, a obtenção do descolamento do vítreo se deu de maneira mais fácil e rápida, pois não foi observado sinal de empalidecimento da superfície retiniana durante a aspiração ativa (comumente encontrado quando existe forte aderência vítreo-retiniana). Uma das dificuldades durante o procedimento foi a avaliação per-operatória do descolamento do vítreo posterior, pois não foram utilizados corantes para identificação da estrutura vítrea para evitar influência no resultado do estudo. Em contrapartida, acreditamos que a utilização de corantes vítreos poderia influenciar positivamente na eficácia do procedimento, bem como na análise de resultados.

Na dose e no tempo de exposição utilizados, o ‘grupo dispase’ não apresentou sinais de toxicidade retiniana em 11 dos 12 olhos. Em ambos os grupos, não foi observada opacidade vítrea logo após o tempo de exposição. No entanto, também em ambos os grupos, foi evidenciada inflamação pós-operatória transitória intra-ocular. No ‘grupo dispase’, o único olho que apresentou reação inflamatória/hemorragica vítrea persistente, durante o seguimento clínico, foi o mesmo que apresentou hemorragia relacionada com o processo de sutura da esclerotomia. Esse olho apresentou opacidade vítrea importante, com uma semana de pós-operatório, e subsequente involução de opacidade vítrea na 4ª semana, com persistência de resíduos fibrino-hemorragicos adjacentes à embainhamento segmentar de vaso retiniano

equatorial. No entanto, apesar dos achados clínicos, a avaliação eletroretinográfica apresentou-se preservada quando comparada ao olho contralateral (não-operado), e ausência de infiltração inflamatória ou desorganização morfológica de parênquima retiniano correspondente.

Como mencionado anteriormente, em nossos estudos experimentais preliminares (dados não publicados), foram testadas doses mais altas, tempos de exposição mais longos e diferentes modelos experimentais e procedimentos com objetivo de induzir o descolamento total do vítreo posterior. Entretanto, observamos evidências reprodutíveis de toxicidade, como hemorragias intra e pré-retinianas e subluxação de cristalino. Porém, tais efeitos colaterais foram evidenciados quando a injeção intravítrea de dispase não era seguida pela aspiração e ‘lavagem’ da cavidade vítrea e teórica remoção do efeito enzimático remanescente. Em estudo recentemente publicado, Wang et al. (2004) confirmaram nossos achados, quando, a partir de 2 horas após injeção de dispase (em concentração semelhante ao utilizado nesse estudo), se evidenciaram sinais de toxicidade semelhantes.

Contudo, acreditamos que a realização de core vitrectomia prévia à injeção intravítrea de dispase, teoricamente, propiciaria maior exposição da interface, pois a exérese do gel vítreo possibilitaria a difusão enzimática. Adicionalmente, outro passo cirúrgico importante, na prevenção de potenciais efeitos colaterais, seria a extensa e cuidadosa aspiração do remanescente vítreo, após a indução mecânica do descolamento. Assim, existe a possibilidade de persistência de pequena quantidade de remanescente enzimático, e esta pode ter sido a causa de tais achados clínicos (opacidade persistente e embainhamento vascular segmentar) em um único olho no ‘grupo dispase’, apesar de não se apresentarem típicos sinais tóxicos, anteriormente descritos pela injeção desta enzima.

A análise eletroretinográfica, dentre todos os animais estudados, em ambos os grupos, apresentou-se simétrica. Os parâmetros analisados foram amplitude e duração da onda B nas

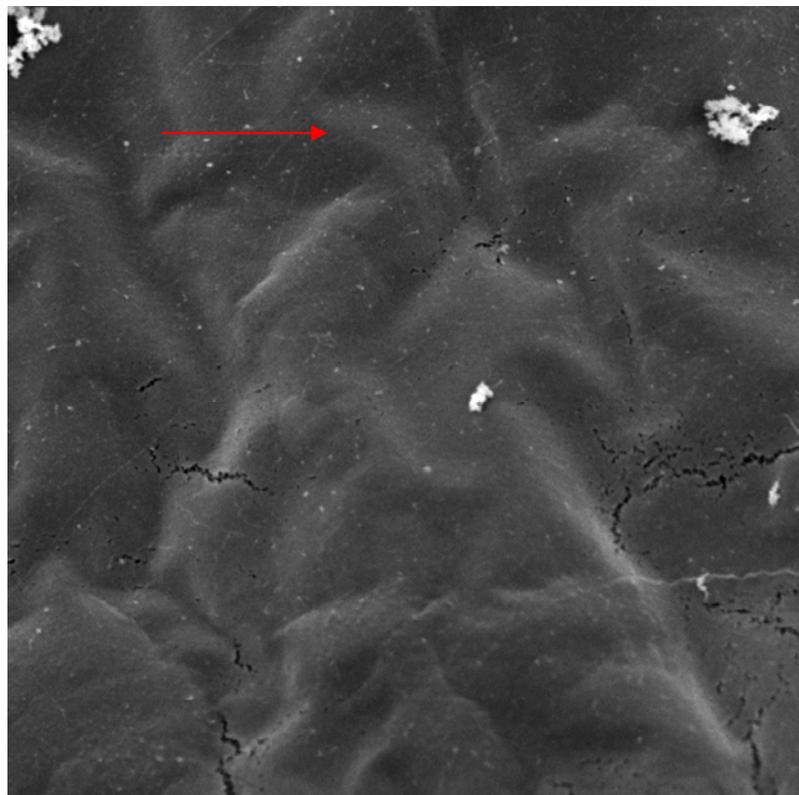
respostas escotópicas, fotópicas 1Hz e fotópicas 29Hz, em que a amplitude, em todas as respostas, apresentou discretamente aumentada nos olhos que se submeteram ao procedimento cirúrgico, tanto no ‘grupo dispase’ quanto no ‘grupo controle’. Existe a hipótese de que a vitrectomia aumente a oxigenação do tecido retiniano desses suínos (em fase de desenvolvimento), aumentando, consistentemente, a amplitude, quando comparada com o olho contralateral. Essa hipótese poderia ser confirmada com a análise eletrofisiológica pré-operatória.

A microscopia eletrônica de varredura (MV) foi considerada o “padrão ouro” para análise da superfície retiniana e seu estado, quanto à presença de colágeno vítreo, confirmando as impressões clínicas tanto em olhos onde foi possível evidenciar a dissecção da hialóide ou descolamento do anel de Weiss (DVP total), quanto em olhos onde esses achados não foram encontrados e a graduação do DVP se mostrou indeterminada. No ‘grupo dispase’, os 5 olhos, primariamente considerados indeterminados, classificaram-se, após MV, como DVP parcial, confirmando a alta sensibilidade dos achados clínicos trans-operatórios na detecção do DVP total. No ‘grupo controle’ dos 4 olhos considerados inicialmente indeterminados, 2 confirmaram-se como DVP parcial e 2 como DVP total.

A incidência de descolamento do vítreo posterior entre os grupos foi analisada usando o Exact 2-sided Wilcoxon e o teste Mann-Whitney, em que a maior incidência de DVP no ‘grupo dispase’, quando comparado com o ‘grupo controle’, mostrou-se estatisticamente significativa ( $p= 0,029$ ). A análise estatística em questão aplica um ranqueamento (designando valores diferenciados) entre os resultados finais entre os grupos do DVP total, parcial e ausente.

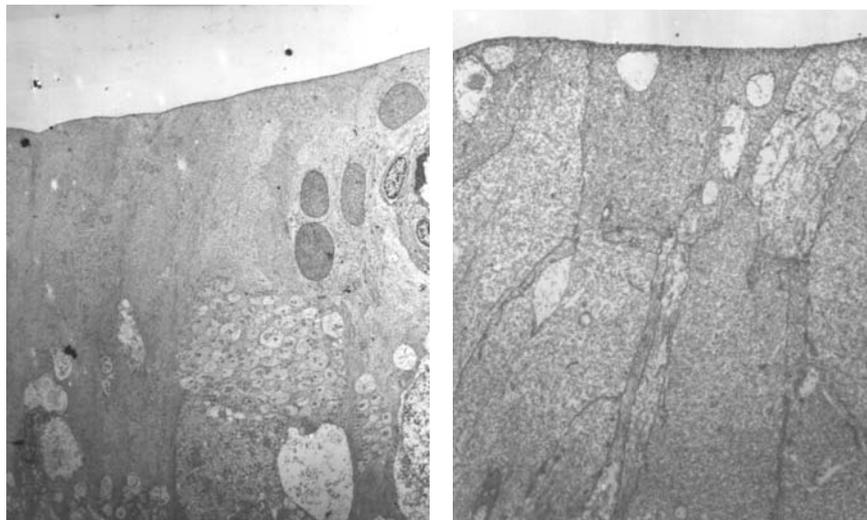
Ainda se baseando na análise com MV, em áreas correspondentes ao descolamento do vítreo, a superfície interna da retina apresentou-se lisa e ondulada sem evidência de fibrilas colágenas subjacentes, assumindo superfície de padrão ondulado com tênues e múltiplas

protuberâncias correspondentes aos pedículos das células de Muller cobertos por MLI intacta (Figura 26). No entanto, em áreas onde o vítreo posterior permaneceu aderido durante o procedimento cirúrgico, evidenciou-se a persistência de fibrilas colágenas compatível com a persistência do vítreo cortical subjacente. Não foram observadas descontinuidades ou desestruturação das camadas da MLI e exposição dos pedículos das células de Muller.



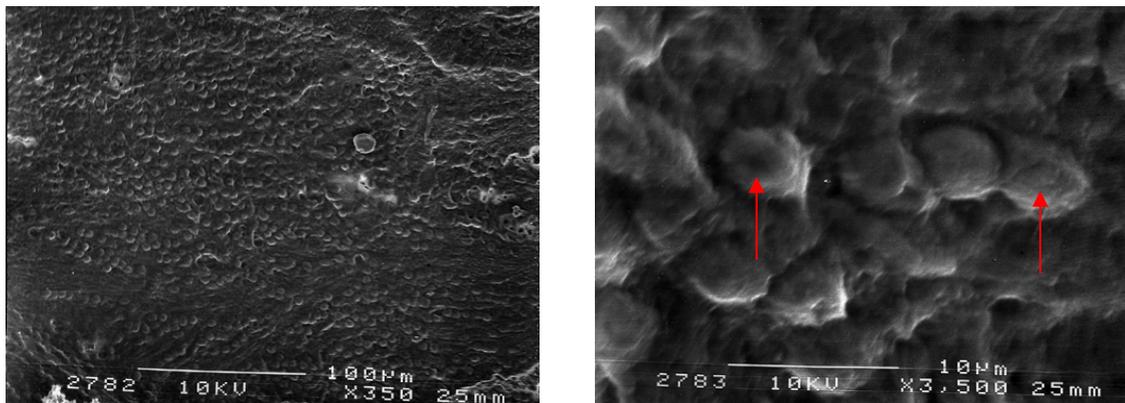
**Figura 26. Microcopia eletrônica de varredura de superfície interna de retina de suíno submetido à vitrectomia associando dispase na indução do vítreo posterior. Notam-se áreas correspondentes ao descolamento do vítreo, superfície interna da retina ondulada sem evidência de fibrilas colágenas subjacentes, assumindo superfície de padrão ondulado com tênues e múltiplas protuberâncias correspondentes aos pedículos das células de Muller cobertos por membrana limitante interna intacta (3.500x)**

Na microscopia de transmissão, a membrana limitante interna apresentou-se presente e com anatomia preservada em ambos os grupos, sendo que áreas correspondentes ao descolamento do vítreo não apresentaram fibrilas colágenas do vítreo com direção paralela e inserção subjacente, e, sim, fibrilas colágenas residuais. Em nossa série, não foram evidenciadas alterações estruturais próprias da membrana limitante interna, descritas por Tezel, Del Priore e Kaplan (1998) como ausência da lâmina rara externa e irregularidades de superfície que são compatíveis com exposição de pedículos das células de Muller. Foi detectada, nos cortes histológicos de ambos os grupos, tanto em olhos submetidos ao procedimento cirúrgico ou não, a presença de vacúolos em parênquima retiniano. Tais achados foram previamente descritos como artefatos de fixação em retina de coelho, o que possivelmente se reproduziu em alguns cortes histológicos (DOI; REFOJO, 1994; DOI et al., 2000) (ver Figura 22; Figura 27).

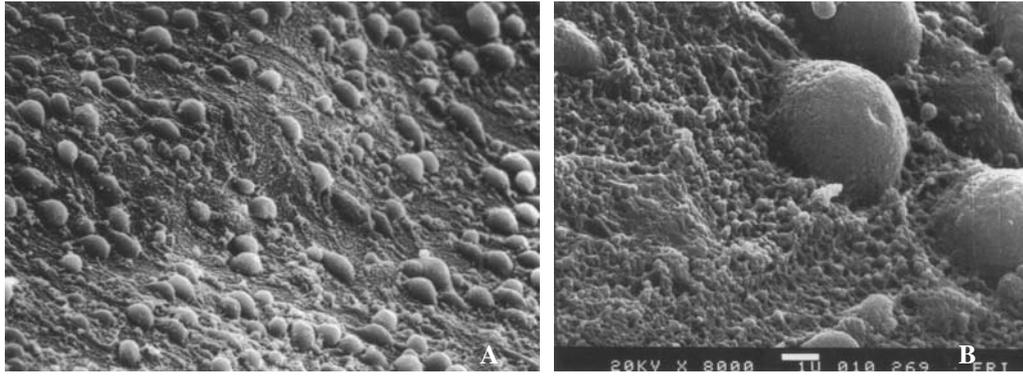


**Figura 27. Microscopia eletrônica de transmissão de superfície vítreo-retiniana de suíno após indução de descolamento do vítreo posterior durante vitrectomia associado à dispase (A; 1000x) e grupo controle (B; 5.000x). Nota-se em porção interna de retina a presença de formações vacuolares, nos dois grupos, secundários ao processo de fixação tecidual**

Em nossa concepção, a evidência histológica de integridade estrutural da MLI tornou-se um achado de extrema relevância, não somente do ponto de vista de eficácia na indução do DVP quanto na segurança do procedimento, pois trata-se de uma evidência da preservação estrutural da superfície retiniana, uma vez que, após o descolamento do vítreo posterior, não foram evidenciadas avulsões de pedículos de células de Muller (SEBAG, 1991), digestão enzimática da MLI e subjacente exposição de pedículos (SEBAG; HAGEMAN, 2000), e perda de tecido retiniano, acompanhado por avulsão de células ganglionares, de bandas axonais em papila do nervo óptico, camadas plexiformes e nucleares internas, bem como roturas foveais parciais e totais (RUSSELL; HAGEMAN, 2001) (Figura 28 e Figura 29).

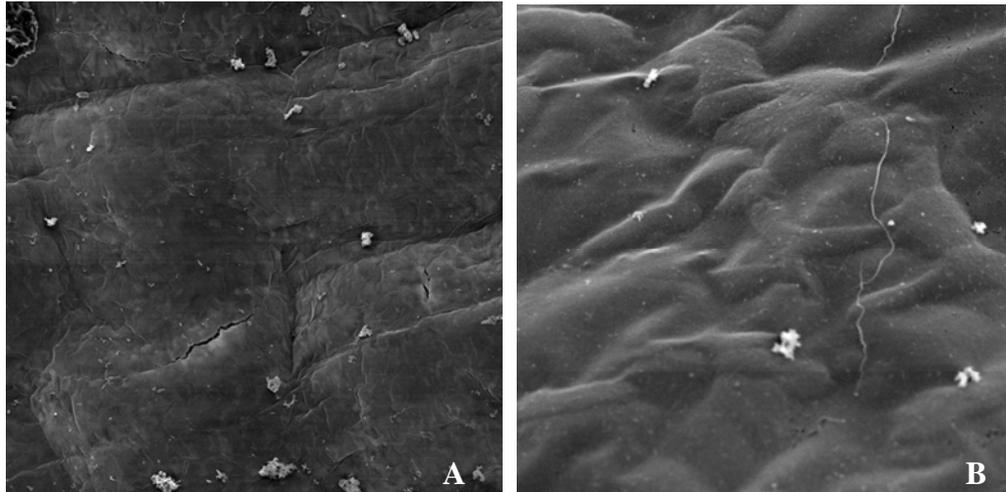


**Figura 28. Microscopia eletrônica de varredura de superfície interna de retina de suíno submetido à injeção intravítrea dispase na tentativa de indução do vítreo posterior (estudo preliminar). A (350x) e B (3.500x). Notam-se múltiplas estruturas arredondadas e protuberantes correspondentes à exposição de pedículos das células de Muller sem evidência de fibrilas colágenas vítreas subjacentes, no entanto, evidenciando aspecto de importante desestruturação de membrana limitante interna subjacente, secundário à prolongada exposição enzimática (24 horas)**



**Figura 29.** Microscopia eletrônica de varredura de interface vítreo-retiniana (superfície interna da retina) de um jovem de 14 anos. Durante a preparação do tecido, complexo esclera-coróide e retina foram dissecados do corpo vítreo. A (1.600x) e B (8.000x). Notam-se múltiplas estruturas arredondadas e protuberantes correspondentes aos pedículos das células de Muller que se encontravam fortemente aderidas ao vítreo, evidenciando sua exposição devido à desestruturação de membrana limitante interna subjacente (nota-se a semelhança morfológica à retina de suíno após a injeção enzimática de dispase – Figura 28) (Fonte: SEBAG, 1991, p. 970)

Em editorial publicado recentemente, Sebag (2003) faz uma análise crítica sobre a importância da MLI e a sua dissecação em diferentes patologias maculares. Segundo o autor, principalmente em crianças, devido à forte aderência, a tentativa de remoção da membrana limitante interna pode provocar a ruptura de processos pediculares das células de Muller e camadas de fibras nervosas (MIURA et al., 2003). Estudos com eletroretinograma focal evidenciaram alterações irreversíveis após o *peeling* da membrana limitante em buracos de macula idiopáticos (TERASAKI et al., 2001). Em nossa série de suínos jovens, baseados na análise de microscopia eletrônica, não evidenciamos ruptura de membrana limitante ou desestruturação em superfície retiniana após a separação do córtex vítreo (Figura 30).



**Figura 30. Microscopia eletrônica de varredura de superfície interna de retina de suíno submetido à vitrectomia associado à dispase na indução do vítreo posterior. Notam-se áreas correspondentes ao descolamento do vítreo, superfície interna da retina ondulada, sem evidência de fibrilas colágenas subjacentes, assumindo superfície de padrão ondulado com tênues e múltiplas protuberâncias correspondentes aos pedículos das células de Muller cobertos por membrana limitante interna intacta (A: 350x; B: 1.500x)**

Portanto, podemos concluir que a dispase associada à vitrectomia facilita o descolamento de vítreo posterior e fornece evidências de baixa toxicidade na dose e forma em que foi utilizada em suínos jovens.

Somente o melhor entendimento da morfologia molecular, da fisiologia vítrea e da dinâmica de fatores e agentes intrínsecos que influenciam a fisiologia vítreo-retiniana propiciará a incorporação da abordagem farmacológica na cavidade vítrea à rotina clínica. Esperamos que as informações obtidas em nossa pesquisa auxiliem no desenvolvimento de protocolos experimentais de vitrectomia farmacológica e contribuam para possível aplicabilidade em futuros estudos clínicos que visem diminuir o índice de complicações relacionadas com a dissecação vítrea.

## 7 CONCLUSÕES

Baseado neste estudo experimental podemos concluir que:

1. A associação de dispase na dose de 50 $\mu$ g à vitrectomia via pars plana facilitou a indução e aumentou a incidência de descolamento do vítreo posterior em suínos.
2. A utilização de dispase na dose de 50 $\mu$ g, em conjunto com a cirurgia de vitrectomia, mostrou ser um procedimento reprodutível de baixa toxicidade, não implicando redução das respostas eletrofisiológicas e ou desorganização histológica da retina neurosensorial em suínos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

- Akiya S, Uemura Y, Saga U. Morphological study on glycosaminoglycans in the developing human vitreous. *Ophthalmic Res (Basel)* 1984;16(3):145-9.
- Anderson DR. Ultrastructure of the optic nerve head. *Arch Ophthalmol (Chicago)* 1970;83(1):63-73.
- Andley UP, Champman SF. Effect of oxidation on conformation of hyaluronic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci (St. Louis)* 1984;25:318.
- Balazs EA. Structure of vitreous gel. *Acta XVII. Concilium Ophthalmologicum* 1954;11:1019-24.
- Balazs EA. *Acta XVIII. Concilium Ophthalmologicum* 1959;2:1296.
- Balazs EA, Toth LZ, Eckl EA, Mitchell AP. Studies on the structure of the vitreous body, XII. Cytological and histochemical studies on the cortical tissue layer. *Exp Eye Res (London)* 1964;89:57-71.
- Balazs EA. Fine structure of developing vitreous. *Int Ophthalmol Clin* 1975;15(1): 53-63.
- Balazs EA, Flood MT. Age-related changes in the physical and chemical state of human vitreous [abstract]. *THIRD INTERNATIONAL CONGRESS FOR EYE RESEARCH, Osaka, Japan.* 1978.
- Balazs EA, Denlinger JL. Aging changes in the vitreous. In: *Aging and human visual function.* Nova York: Allan R. Liss, 1982. p. 45-7.
- Balazs EA, Ozanics V. Functional anatomy of the vitreous. In: *Jakobiec FA (ed). Ocular anatomy, embryology and teratology.* Philadelphia: Harper & Row, 1982. p. 425-40.
- Balazs EA. The vitreous. In: *The Eye.* London: Academic Press, 1984. 1A. p. 533-89.
- Bertazolli-Filho R, Laicine EM, Haddad A. Biochemical studies on the secretion of glycoproteins by isolated ciliary body of rabbits. *Acta Ophthalmol Scand (Copenhagen)* 1996;74:343-7.
- Bloom GD, Balazs EA. An electron microscopic study of hyalocytes. *Exp Eye Res (London)* 1965;4(3):249-55.
- Bishop P. The biochemical structure of mammalian vitreous. *Eye (London).* 1996;10(Pt 6):664-70. [Review]
- Bishop PN. Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Prog Retin Eye Res (Oxford)* 2000;19(3):323-44. [Review]

---

<sup>1</sup> Segundo normas de Vancouver.

- Bussaca A. La structure biomicroscopique du corps vitré normal. *Ann d'Oculist* 1958;91:477-99.
- Chakrabarti B, Hultsch E. Owl monkey vitreous: a novel for hyaluronic acid structural studies. *Biochem Biophys Res Commun (New York)* 1976;71(4):1189-93.
- Comper WD, Laurent TC. Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol Rev (Washington)* 1978;58(1):255-315.
- Curtin BJ. *The myopias-basic science and clinical management*. Philadelphia: Harper & Row, 1985.
- De La Paz MA, Itoh Y, Toth CA, Nagase H. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci (St Louis)* 1998;39(7):1256-60.
- Doi M, Refojo MF. Histopathology of rabbit eyes with intravitreal silicone-fluorosilicone copolymer oil. *Exp Eye Res (London)* 1994;59(6):737-46.
- Doi M, Ning M, Semba R, Uji Y, Refogo MF. Histopathologic abnormalities in rabbit retina after intravitreal injection of expansive gases and air. *Retina (Philadelphia)* 2000;20(5):506-13.
- Eisner G, Bachmann E. Slit-lamp examination of unfixed vitreous in sheep, pigs, dogs, apes and rabbits. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol (Berlin)* 1974;192(1):9-17.
- Elner SG, Elner VM. The integrin superfamily and the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci (St Louis)* 1996;37(5):696-701. [Review]
- Endophthalmitis Vitrectomy Study. Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study. A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. *Arch Ophthalmol (Chicago)* 1995;113(12):1479-96.
- Forrester JV, Balazs EA. Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology (Oxford)* 1980;40(3):435-46.
- Foos RY. Posterior vitreous detachment. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol (Rochester, Minn)* 1972a;76(2):480-97.
- Foos RY. Vitreoretinal juncture; topographical variations. *Invest Ophthalmol (St Louis)* 1972b;11(10):801-8.
- Foos RY, Gloor BP. Vitreoretinal juncture; healing of experimental wounds. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol (Berlin)* 1975;196(3):213-20.
- Foulds WS. Do we need a retinal pigment epithelium (or choroids) for the maintenance of retinal apposition? *Br J Ophthalmol (London)* 1985;69(4):237-9.
- Frenzel EM, Neely KA, Walsh AW, Cameron JD, Gregerson DS. A new model of proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci (St Louis)* 1998;39(11):2157-64.
- Goldmann H. Senescenz des glaskorpers. *Ophthalmologica (Basel)* 1962;143:253-79.

- Green WR. Vitreo retinal juncture. In: Retinal disease. St. Louis: CV Mosby, 1989. p. 13-69.
- Gregor Z, Ryan SJ. Combined posterior contusion and penetrating injury in the pig eye. II. Histological features. *Br J Ophthalmol (London)* 1982;66(12):799-804.
- Haddad A, André JC. Hyalocyte-like cells are more numerous in the posterior chamber than they are in the vitreous of the rabbit eye. *Exp Eye Res (London)* 1998;66(6):709-18.
- Haddad A, Laicine EM, De Almeida JC, Costa MSA. Partial characterization, origin and turnover of glycoproteins of the rabbit vitreous body. *Exp Eye Res (London)* 1990a;51(2):139-43.
- Haddad A, De Almeida JC, Laicine EM, Fife RS, Pelletier G. The origin of the intrinsic glycoproteins of the rabbit vitreous body: an immunohistochemical and autoradiographic study. *Exp Eye Res (London)* 1990b;50(5):555-61.
- Haddad A, Laicine EM. Studies on the origin of the glycoproteins of the rabbit vitreous body using a protein-synthesis inhibitor and radioactive fucose and amino acids. *Ger J Ophthalmol (Berlin)* 1993;2(2):127-32.
- Hageman GS, Hewitt AT, Kirchoff M, Johnson LV. Selective extraction and characterization of cone matrix sheath-specific molecules [abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci (St Louis)* 1989;30(suppl):S489.
- Hageman GS, Russell SR. Chondroitinase-mediated disinsertion of the primate vitreous body. [abstract] *Invest Ophthalmol Vis Sci (St Louis)* 1994;35(suppl):1260.
- Heergaard S, Jensen OA, Prause JU. Structure of the vitreal face of the monkey optic disc (*Macacca mulatta*) - SEM on frozen resin-cracked optic nerve heads supplemented by TEM and immunohistochemistry. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol (Berlin)* 1998;226:377-83.
- Hikichi T, Yanagiya N, Kado M, Akiba J, Yoshida A. Posterior vitreous detachment induced by injection of plasmin and sulfur hexafluoride in the rabbit vitreous. *Retina (Philadelphia)* 1999;19(1):55-8.
- Hogan MJ. The vitreous: its structure in relation to the ciliary body and retina proctor award lecture. *Invest Ophthalmol (St Louis)* 1963;51:418-45.
- Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE. *Histology of the human eye*. Philadelphia: WB Saunders, 1971. 607p.
- Hyams SW, Neumann E, Friedman Z. Myopia-aphakia II. Vitreous and peripheral retina. *Br J Ophthalmol (London)* 1975;59(9):483-5.
- Ingber D. Integrins as mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol (Philadelphia)* 1991;3(5):841-8.
- Jack RL. Regression of the hyaloid vascular system. An ultrastructural analysis. *Am J Ophthalmol (Chicago)* 1972a;74(2):261-72.

- Jack RL. Ultrastructure of the hyaloid vascular system. *Arch Ophthalmol (Chicago)* 1972b;87(5):555-67.
- Jackson DS. Chondroitin sulphuric acid as a factor in the stability of tendon. *Biochem J (London)* 1953;54(4):638-41.
- Jacobson B. Biosynthesis of hyaluric acid in the vitreous. V. Studies on a particulate hyalocyte glycosyl transferase. *Exp Eye Res (London)* 1978;27:247-58.
- Jacobson B. Identification of sialyl and galactosyl transferase activities in calf vitreous hyalocytes. *Curr Eye Res (London)* 1984;3(8):1033-41.
- Jerdan JA, Kao L, Glaser BM. The inner limiting membrane: a modified basement membrane? *Invest Ophthalmol Vis Sci (St Louis)* 1986; 27(suppl):230.
- Jorge R, Oyamaguchi EK, Cardillo JA, Gobbi A, Laicine EM, Haddad A. Intravitreal injection of dispase causes retinal hemorrhages in rabbit and human eyes. *Curr Eye Res (Lisse, Netherlands)* 2003;26(2):107-12.
- Kamei A, Totani A. Isolation and characterization of minor glycosaminoglycans in the rabbit vitreous body. *Biochem Biophys Res Commun (New York)* 1982;109(3):881-7.
- Kohno T, Sorgente N, Ishibaschi T, Goodnight R, Ryan SJ. Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci (St Louis)* 1987;28(3):506-14.
- Laicine E, Haddad A. Transferrin, one of the major vitreous proteins, is produced within the eye. *Exp Eye Res (London)* 1994;59(4):441-6.
- Laurent UB, Fraser JR. Turnover of hyaluronate in the aqueous humour and vitreous body of the rabbit. *Exp Eye Res (London)* 1983;36(4):493-503.
- Lindner B. Acute posterior vitreous detachment and its retinal complications: a clinical biomicroscopic study. *Acta Ophthalmol (Copenhagen)* 1966;87(suppl):1-108.
- Machemer R, Buettner H, Norton EW, Parel JM. Vitrectomy: a pars plana approach. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol (Rochester, Minn)* 1971;75(4):813-20.
- Mann, I. The vitreous and suspensory ligament of the lens. In: *The Development of the human eye*. New York: Grune & Stratton, 1964. p. 150.
- Margherio AR, Margherio RR, Hartzler M, Trese MT, Williams GA, Ferrone PJ. Plasmin enzyme-assisted vitrectomy in traumatic pediatric macular holes. *Ophthalmology (Rochester, Minn)* 1998;105(9):1617-20.
- Mathews MB. The interaction of collagen and acid mucopolysaccharides. A model for connective tissue. *Biochem J (London)* 1965;96(3):710-6.
- Maumenee IH. Vitreoretinal degeneration as a sign of generalized connective tissue diseases. *Am J Ophthalmol (Chicago)* 1979;88(3 Pt 1):432-49.

Maurice DM, Mishima S. Ocular pharmacokinetics. In: Sears ML (ed). *Pharmacology and the eye*. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 19-116.

Men G, Peyman GA, Genaidy M, Kuo PC, Ghahramani F, Blake DA, et al. The role of recombinant lysine-plasminogen and recombinant urokinase and sulfur hexafluoride combination in inducing posterior vitreous detachment. *Retina (Philadelphia)* 2004;24(2):199-209.

Miura M, Elsner AE, Osako M, Iwasaki T, Okano T, Usui M. Dissociated optic nerve fiber layer appearance after internal limiting membrane peeling for idiopathic macular hole. *Retina (Philadelphia)* 2003;23(4):561-3.

Moore RF. Subjective lightning streak. *Br J Ophthalmol (London)* 1935;19:545.

Mutlu F, Leopold IH. The structure of human retinal vascular system. *Arch Ophthalmol (Chicago)* 1964;71:93-101.

Newsome DA, Linsenmayer TF, Trelstad RL. Vitreous body collagen: evidence for a dual origin from the neural retina and hyalocytes. *J Cell Biol (New York)* 1976;71:59-67.

Oliveira LB, Tatebayashi M, Mahmoud TH, Hao Y, Peters RM, Wong F, et al. Dispase-assisted vitrectomy facilitates posterior vitreous detachment in young porcines. [abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci (St Louis)* 2000;41(suppl):344.

Oliveira LB, Meyer CH, Tatebayashi M, Toth CA, Kumar J, Wong F, et al. Intravitreal injection of Arg-Gly-Asp (RGD) peptide facilitates surgical creation of a posterior vitreous detachment in young pigs. [abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci (St Louis)* 2001;42(suppl):422.

Oliveira LB, Meyer CH, Kumar J, Tatebayashi M, Toth CA, Wong F, et al. RGD peptide-assisted vitrectomy to facilitate induction of a posterior vitreous detachment: a new principle in pharmacological vitreolysis. *Curr Eye Res (London)* 2002;25(6):333-40.

O'Malley P. The pattern of vitreous syneresis: a study of 800 autopsy eyes. In: Irvine AR, O'Malley P. (eds). *Advances in vitreous surgery*. Springfield (IL): CC Thomas, 1976. p. 17-33.

Petters RM, Alexander CA, Wells KD, Collins EB, Sommer JR, Blanton MR, et al. Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa. *Nat Biotechnol (New York)* 1997;15(10):965-70

Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Influence of stereochemistry of the sequence ARG-GLY-ASP-XAA on binding specificity in cell adhesion. *J Biol Chem (Baltimore)* 1987;262(36):17294-8.

Pirie A. The effect of hyaluronidase injection on vitreous humour of rabbit. *Br J Ophthalmol (London)* 1949;33(11):678-84.

Rhodes RH. An ultrastructural study of the complex carbohydrates of the mouse posterior vitreoretinal juncture. *Invest Ophthalmol Vis Sci (St Louis)* 1982;22(4):460-77.

Ruoslahti E, Hayman EG, Engvall E. Molecular interactions of fibronectin. *Prog Clin Biol Res (New York)* 1980;41:821.

Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest (New Haven)* 1991;87(1):1-5. [Review]

Russell SR, Shepherd JD, Hageman GS. Distribution of glycoconjugates in the human retinal internal limiting membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci (St Louis)* 1991;32(7):1986-95.

Russell SR, Hageman GS. Optic disc, foveal, and extrafoveal damage due to surgical separation of the vitreous. *Arch Ophthalmol (Chicago)* 2001;119(11):1653-8.

Scott JE. The chemical morphology of the vitreous. *Eye (London)* 1992;6(Pt 6):553-5. [Review]

Sebag J, Balazs EA, Eakins KE, Kulkarni PS. The effect of Na-Hyaluronate on prostaglandin synthesis and phagocytosis by mononuclear phagocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci (St Louis)* 1981;20:33.

Sebag J, Balazs EA. Human vitreous fibres and vitreoretinal disease. *Trans Ophthalmol Soc U K (London)* 1985;104(Pt 2):123-8.

Sebag J. Age-related changes in human vitreous structure. *Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol (Berlin)* 1987;225(2):89-93.

Sebag J. Development and aging of the vitreous. In: *The Vitreous*. New York: Springer-Verlag. 1989. p. 73-95.

Sebag J, Balazs EA. Morphology and ultrastructure of human vitreous fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci (St Louis)* 1989;30(8):1867-71.

Sebag J. Age-related differences in the human vitreoretinal interface. *Arch Ophthalmol (Chicago)* 1991;109(7):966-71.

Sebag J. Anatomy and pathology of the vitreo-retinal interface. *Eye (London)* 1992;6(Pt 6):541-52. [Review]

Sebag J. Diabetic vitreopathy. *Ophthalmology (Rochester, Minn)* 1996;103(2):205-6. [Review]

Sebag J. Pharmacologic vitreolysis. *Retina (Philadelphia)* 1998;18(1):1-3. [Review]

Sebag J, Hageman GS. *Interfaces*. Roma: Fondazione G.B. Bietti, 2000. 81p.

Sebag J. Indocyanine green-assisted macular hole surgery: too pionering? *Am J Ophthalmol (Chicago)* 2003;137(4):744-6.

Seery CM, Davison PF. Collagens of the bovine vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci (St Louis)* 1990;32:1540-50.

Smith GN Jr, Linsenmayer TF, Newsome DA. Synthesis of type II collagen in vitro by embryonic chick neural retina tissue. *Proc Natl Acad Sci USA (Washington)* 1976;73(12):4420-3.

- Snowden JM, Eyre DR, Swann DA. Age-related changes in the thermal stability and crosslinks of vitreous, articular cartilage and tendon collagens. *Biochim Biophys Acta* (New York) 1982;706(2):153-7.
- Spencer WH. Vitreous. In: *Ophthalmic pathology. An Atlas and Textbook. v. 2.* Philadelphia: WB Saunders, 1985. p. 548-88.
- Spurr SJ, Gipson IK. Isolation of corneal epithelium with Dispase II or EDTA. Effects on the basement membrane zone. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (St Louis) 1985;26(6):818-27.
- Stenn KS, Link R, Moellmann G, Madri J, Kuklinska E. Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J Invest Dermatol* (Baltimore) 1989;93(2):287-90.
- Sturner WO, Dowdey AB, Putnam RS, Dempsey JL. Osmolality and other chemical determinations in postmortem human vitreous humor. *J Forensic Sci* (Chicago) 1972;17(3):387-93.
- Swann DA, Constable IJ, Caulfield JB. Vitreous structure IV. Chemical composition of the insoluble residual protein fraction from the rabbit vitreous. *Invest Ophthalmol* (St Louis) 1975;14(8):613-6.
- Swann DA, Sotman SS. The chemical composition of bovine vitreous-humour collagen fibres. *Biochem J* (London) 1980;185(3):545-54.
- Sweeney DB, Balazs EA. Fate of collagen and hyaluronic acid gels and solutions injected into the vitreous of the owl monkey. *Invest Ophthalmol* (St Louis) 1964;3:473.
- Tanaka M, Qui H. Pharmacological vitrectomy. *Semin Ophthalmol* (Orlando) 2000;15(1):51-61. [Review]
- Teng CC, Chi HH. Vitreous changes and the mechanism of retinal detachment. *Am J Ophthalmol* (Chicago) 1957;44(3):335-56.
- Terasaki H, Miyake Y, Nomura R, Piao CH, Hori K, Niwa T, et al. Focal macular ERGs in eyes after removal of macular ILM during macular hole surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (St Louis) 2001;42(1):229-34.
- Tezel TH, Del Priore LV, Kaplan HJ. Posterior vitreous detachment with dispase. *Retina* (Philadelphia) 1998;18(1):7-15.
- Thomas EL, Kuppermann BD, Grillone LR, North American Vitrase Study Group. A phase 3 double-masked, prospective, randomized, placebo-controlled study of purified ovine hyaluronidase under investigation for the treatment of vitreous hemorrhage. [abstract] *Invest Ophthalmol Vis Sci* (St Louis) 2003;44:4284.
- Verstraeten TC, Chapman C, Hartzler M, Winkler BS, Trese MT, Williams GA. Pharmacologic induction of posterior vitreous detachment in the rabbit. *Arch Ophthalmol* (Copenhagen) 1993;111(6):849-54.

Von der Mark K, Von der Mark H, Timpl R, Trelstad RL. Immunofluorescent localization of collagen types types I, II and III in the embryonic chick eye. *Dev Biol (New York)* 1977;59(1):75-85.

Von der Mark K. Localization of collagen types in tissues. *Int Rev Connect Tissue Res (New York)* 1981;9:265-324. [Review]

Wang F, Wang Z, Sun X, Wang F, Xu X, Zhang X. Safety and efficacy of dispase and plasmin in pharmacologic vitreolysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci (St Louis)* 2004;45(9):3286-90.

Williams JA. Disintegrins: RGD-containing proteins which inhibit cell/matrix interactions (adhesion) and cell/cell interactions (aggregation) via the integrin receptors. *Pathol Biol (Paris)* 1992;40(8):813-21. [Review]

Wong HC, Sehmi KS, McLeod D. Abortive neovascular outgrowths discovered during vitrectomy for diabetic vitreous haemorrhage. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol (Berlin)* 1989;27(3):237-40.

Yamada E. Some structural features of the fovea centralis in the human retina. *Arch Ophthalmol (Copenhagen)* 1969;82(2):151-9.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)