LUIS EDUARDO MORATO REBOUÇAS DE CARVALHO

**Utilização da triancinolona como agente
modulador da resposta inflamatória na cirurgia de
músculo extra-ocular em coelhos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Milton Ruiz Alves

**SÃO PAULO
2006**

“Toda grande jornada começa com um simples passo”

Anônimo

DEDICATÓRIA

À minha esposa, companheira de todas as horas,
Adriana, verdadeira expressão da “arte de sorrir
mesmo quando a vida diz não”.

Aos meus amados filhos **Carlos Eduardo** e
Gustavo, presença alegre e revitalizante em
todos os momentos.

Aos meus pais **Joaquim Rebouças** e **Maria
Francisca**, pelo amor incondicional sempre
presente.

Às minhas famílias **Rebouças de Carvalho** e
Rahal, laços de amor e convivência.

AGRADECIMENTOS

**“Quando sonhamos sozinhos é só um sonho;
mas quando sonhamos juntos é o início de
uma nova realidade”.**

Dom Helder Câmara

Agradeço aos participantes deste sonho.

Ao **Prof. Dr. Newton Kara-José**, Professor Titular do Departamento de Oftalmologia da Universidade de São Paulo e UNICAMP, ícone da oftalmologia brasileira, responsável pela pujança do Departamento de Oftalmologia da USP e pela oportunidade de realizar esta pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Milton Ruiz Alves**, Professor Livre Docente Doutor, Diretor do Setor de Córnea e Doenças Externas da Universidade de São Paulo, orientador e amigo, sempre com a colocação serena e adequada nos momentos críticos.

Ao Prof. Dr. **Mário Luis Ribeiro Monteiro**, Professor Livre Docente Doutor, Diretor da Pós-Graduação do Departamento de Oftalmologia da Universidade de São Paulo, “motor” da pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Alves**, Professor Livre Docente Doutor, pela oportunidade de iniciar esta pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Carlos Ramos Souza-Dias**, Professor Livre Docente Doutor, “eterno” Diretor do Setor de Estrabismo do Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, mente brilhante e afiada, orgulho e motivação para os que prezam a atividade científica.

Ao **Prof. Dr. Fares Rahal**, Professor Livre Docente, exemplo de correção, pragmatismo e dedicação ao ensino, minha admiração, orgulho e amor “paternal”.

À **Prof^a. Dr^a. Maria Antonieta Longo Galvão da Silva**, Doutora em Medicina e Médica do Departamento de Ciências Patológicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pela análise histológica realizada neste estudo.

Ao **Prof. Dr. José Rafael Macéa** e **Prof^a. Dr^a. Celina Siqueira Barbosa Pereira**, pela amizade e recepção no Departamento de Morfologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

À **Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Nishiwaki-Dantas**, Diretora do Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, amiga, incentivadora e parceira de novas idéias e projetos.

Ao **Prof. Dr. Paulo Elias C. Dantas**, amigo e exemplo de vencedor.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Francisco Gaal Vadas**, amigo e parceiro nas várias etapas deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Roberto M. Endo, Dr. Carlos F. Uesugui, Dr. Oswaldo P. Mariano Jr., Prof. Dr. Mauro Goldchmit, Prof. Dr. Ronaldo B. Barcellos** e demais colegas da Sessão de Estrabismo do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pelo apoio, amizade e cumplicidade nesta jornada.

Aos amigos e companheiros de labuta, **Prof. Dr. José Ricardo de Abreu Reggi, Dr. Marcos Carvalho da Cunha e Dr. Ricardo T. L. Waetge.**

Aos colegas e funcionários da **Unidade de Técnica Cirúrgica** da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pela ajuda e parceria no trato com os animais estudados.

À OPTHALMOS, na figura do **Diretor Acácio Alves de Souza Lima Filho**, pelo apoio e exemplo de realização.

Ao **Sr. Juan Pablo F. de la Plata**, membro da empresa Johnson & Johnson - Ethicon, pela inestimável ajuda e solidariedade.

Ao **Dr. Wilmar R. Silvino**, pelo olhar atento durante a análise estatística dos resultados finais desta pesquisa.

À **Regina Ferreira de Almeida**, secretária da Pós-graduação do Departamento de Oftalmologia da Universidade de São Paulo, por seu trabalho árduo, extremamente responsável e eficaz de ajudar a organizar a vida dos pós-graduandos do Departamento de Oftalmologia.

À **Rose Jambwisch** e **Dalila Dias da Silva**, secretárias e auxiliares sempre disponíveis.

À **Santa Casa de São Paulo**, na figura de seus pacientes e corpo docente, pela oportunidade do aperfeiçoamento médico.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Listas
Resumo
Summary

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	23
3 MÉTODOS	26
3.1 Desenho do estudo.....	27
3.2 Aspectos éticos.....	27
3.3 Estimativa do tamanho e poder da amostra	28
3.4 Identificação dos animais.....	28
3.5 Anestesia	28
3.6 Técnica operatória	29
3.7 Preparação e Aplicação da Triancinolona e da Solução de cloreto de sódio a 0,9% (Solução Salina)	30
3.8 Estudo piloto	31
3.9 Exenteração.....	32
3.10 Análise histológica	32
3.11 Morfometria.....	39
3.11.1 Características do sistema Axioskop 40.....	39
3.11.2 Método de análise das lâminas	40
3.12 Método estatístico.....	43
3.12.1 Estatística descritiva das amostras	43
3.12.2 Estatística analítica ou comparativa dos dados gerais	43

4	RESULTADOS	45
4.1	Características dos animais da amostra	46
4.2	Resultados da análise histológica	48
4.3	Resultados da morfometria da reação granulomatóide	51
4.4	Correlações entre a análise histológica e a morfometria da reação granulomatóide	58
4.5	Correlações entre o peso dos animais e a morfometria da reação granulomatóide	61
5	DISCUSSÃO	64
5.1	A escolha da droga	65
5.2	O modelo animal, a agressão cirúrgica e conseqüente reação tecidual	70
5.3	Avaliação da reação inflamatória	72
6	CONCLUSÕES	78
7	ANEXOS	81
8	REFERÊNCIAS	86

FONTES CONSULTADAS

LISTAS

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

5-FU	- 5 Fluoracil
AINH	- Antiinflamatório não hormonal
ANOVA	- Análise de variância
ARVO	- <i>The Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
Hg	- Mercúrio
MMC	- Mitomicina C
P	- Probabilidade de erro
pH	- potencial de hidrogênio iônico
RI	- Músculo reto Inferior
RNA	- Ácido ribonucléico
RS	- Músculo reto superior
SAL	- Solução de cloreto de sódio a 0,9%
SPSS	- Statistical Package for Social Science
TRI	- Triancinolona acetonida
u	- unidade de massa atômica, igual a 1/12 da massa do isótopo do carbono-12

α	- Risco alfa
β	- Risco beta
μm^2	- Micra quadrada
π	- Representa o número equivalente à razão entre a circunferência e o diâmetro de um círculo, ou seja, pi.
χ^2	- Teste do chi-quadrado
HE	- Hematoxilina-eosina
TM	- Tricromo de Masson

FIGURAS

Figura 1 -	Esquema simplificado da Patogênese das Aderências decorrentes de um traumatismo. O organismo, em frações de segundos, reage com produção de mediadores químicos, que, direta ou indiretamente, gerarão a reação inflamatória e cicatricial [adaptado de Jack (1998)]	05
Figura 2 -	Cânula Sharpoint® modelo 3424 (Imagem divulgada pelo fabricante)	31
Figura 3 -	Aspecto do bulbo ocular imediatamente após a exenteração da órbita.....	33
Figura 4 -	Ausência de infiltrado inflamatório em meio ao tecido muscular (hematoxilina-eosina 50X)	36
Figura 5 -	Infiltrado inflamatório discreto, em meio ao tecido muscular (hematoxilina-eosina 50X)	36
Figura 6 -	Infiltrado inflamatório moderado, em meio ao tecido muscular (hematoxilina eosina 50X)	37

Figura 7 -	Infiltrado inflamatório intenso, meio ao tecido muscular (hematoxilina-eosina 50X).....	37
Figura 8 -	Visão superior do retrocesso do músculo reto superior após cauterização do leito escleral e sutura	38
Figura 9 -	Bisturi eletrônico Emai, modelo bp-150 (Imagem disponibilizada pelo fabricante)	38
Figura 10 -	Axioskop 40 (imagem divulgada pelo fabricante).....	40
Figura 11 -	Área de reação granulomatóide, delimitada pela linha vermelha, ao redor do material de sutura (hematoxilina-eosina 25X).....	42
Figura 12 -	Área de reação granulomatóide, delimitada pela linha vermelha, ao redor do material de sutura (tricromo de Masson 25X)	42

QUADROS

- Quadro 1 - Medidas do peso dos animais no momento da cirurgia para exenteração das órbitas. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004..... 46
- Quadro 2 - Medidas descritivas para o peso dos coelhos. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004..... 47
- Quadro 3 - Tipo de infiltrado inflamatório presente nos cortes histológicos segundo a substância aplicada no ato cirúrgico realizado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004 48
- Quadro 4 - Área das reações granulomatóides, presentes nos cortes histológicos, submetidos à coloração hematoxilina-eosina. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004 51
- Quadro 5 - Área das reações granulomatóides, presentes nos cortes histológicos, submetidos à coloração tricromo de Masson. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004 53

TABELAS

- Tabela 1 - Número e respectiva porcentagem de animais segundo o tipo de infiltrado inflamatório e a substância aplicada no ato cirúrgico. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004..... 49
- Tabela 2 - Número e respectiva porcentagem de animais segundo o tipo de infiltrado inflamatório e substância aplicada no ato cirúrgico, após a redistribuição das categorias. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004 50
- Tabela 3 - Medidas descritivas (em μm^2) para a área de reação granulomatóide segundo o tipo de substância, em razão da coloração utilizada. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004..... 56
- Tabela 4 - Valores dos coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis (peso dos coelhos e área de reação granulomatóide) envolvidas neste estudo 63

GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Perfil individual para a área da reação granulomatóide medida nas lâminas coradas com hematoxilina-eosina, segundo o tipo de substância utilizada. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004 52
- Gráfico 2 - Perfil individual para a área da reação granulomatóide medida nas lâminas coradas com tricromo de Masson, segundo o tipo de substância utilizada. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004 54
- Gráfico 3 - Perfil médio para a área da reação granulomatóide segundo o tipo de substância, em cada coloração utilizada. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004 55
- Gráfico 4 - Box plot da área de reação granulomatóide, segundo o grau da inflamação, na coloração hematoxilina-eosina. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004..... 58

Gráfico 5 - Box plot da área de reação granulomatóide, segundo o grau da inflamação, na coloração tricromo de Masson. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004.....	60
Gráfico 6 - Diagrama de dispersão da área da reação granulomatóide em função do peso dos coelhos, na coloração hematoxilina-eosina. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004.....	61
Gráfico 7 - Diagrama de dispersão da área da reação granulomatóide em função do peso dos coelhos, na coloração tricromo de Masson. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004.....	62

RESUMO

Carvalho LEMR. *Utilização da triancinolona como agente modulador da resposta inflamatória na cirurgia de músculo extra-ocular em coelhos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 99p.

Objetivo: Avaliar a eficiência da Triancinolona Acetonida como agente modulador da resposta inflamatória e cicatricial em coelhos submetidos a cirurgia de músculo extra-ocular. **Método:** Foi realizado estudo prospectivo, mascarado, em dois estádios. No primeiro estágio, dez coelhos foram submetidos a retrocesso do músculo reto superior em ambos os olhos. Aplicou-se, em um deles, 0,15 cc de Triancinolona Acetonida (40mg/cc) nos tecidos circunjacentes ao local de reinserção muscular e, como controle, 0,15cc de solução de cloreto de sódio a 0,9% no local equivalente no olho contra-lateral. Quinze dias após, cinco coelhos foram submetidos a exenteração das órbitas e os restantes dos animais tiveram o mesmo procedimento realizado após trinta dias. O material do sítio de reinserção muscular foi avaliado por meio de análise histopatológica qualitativa e quantitativa (morfometria). No segundo estágio, com incrementação da agressão cirúrgica, dezesseis coelhos foram submetidos aos mesmos procedimentos com exenteração das órbitas após quinze dias, e posterior análise histopatológica dos tecidos. **Resultados:** Houve efeito inibitório sobre a intensidade da resposta inflamatória nos olhos tratados em comparação com os olhos controle. **Conclusão:** Nas condições de realização do presente estudo o uso per-operatório da triancinolona acetona foi efetivo no controle da resposta inflamatória em olhos de coelhos submetidos a cirurgia de músculo extra-ocular.

Descritores: 1. Estrabismo/cirurgia, 2. Cicatrização de feridas, 3. Aderências, 4. Triancinolona acetona, 5. Coelhos

SUMMARY

Carvalho LEMR. *Experimental extraocular surgery in rabbits with triamcinolone: outcomes and effects on inflammatory response* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 99p

Purpose: To evaluate the efficiency of triamcinolone acetonide (TRI) in limiting the postoperative inflammatory response and scarring following strabismus surgery. **Methods:** A prospective, two-stage, masked, controlled trial was conducted. In the first stage, the inflammatory response at the extraocular reattachment site was analyzed following superior rectus recession in ten rabbits. One eye had 0,15 cc of triamcinolone acetonide (40mg/cc) applied around the new insertion site and, similarly, 0,15 cc of isotonic saline solution (0,9%) was applied to the fellow eye following the same procedure, thus serving as a control. Fifteen days later, orbital exenteration was performed in five rabbits and the remaining five were exenterated thirty days later. The reattachment site tissues were submitted to qualitative and quantitative histological examinations. In the second stage 16 rabbits were submitted to amplified surgical trauma, after which the aforementioned steps were also carried out. Granuloma total area at the extraocular muscle reattachment sites of control and treated eyes were compared. **Results:** There was an inhibitory effect of TRI on the inflammatory response of treated eyes as compared to control eyes. **Conclusions:** TRI was effective in controlling the postoperative inflammatory response in rabbit eyes submitted to traumatic recession of the superior rectus muscle.

Descriptors: 1. Strabismus/surgery, 2. Wound healing, 3. Adhesions, 4. Triamcinolone acetonide, 5.Rabbits

1 INTRODUÇÃO

O tratamento cirúrgico do estrabismo tem passado por diversos estádios, mas a previsibilidade do ato operatório continua a ser perseguida (Ingram, 1965).

Não sabemos como as operações funcionam (Knapp, 1958) e qual o problema existente com retrocessos e ressecções em que a aderência dos músculos extra-oculares com a esclera se dá de forma anômala.

A operação proposta por Dieffenbach (Teichmann, 1999) foi modificada diversas vezes, mas o processo de cicatrização da ferida cirúrgica foi estudado por poucos.

A cicatrização é o processo pelo qual um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado, condição capaz de ocorrer independentemente de ser a origem da lesão traumática ou necrótica. Em ferida cirúrgica, o sangue extravasado pelo corte forma um coágulo que, conjuntamente com o tecido lesado, estimula a produção de fatores quimiotáticos e vasoativos, indutores da exsudação de fagócitos para as margens da lesão. Após seis horas do ato cirúrgico, a margem da ferida contém fagócitos e, ao redor de 24 horas, o coágulo já está invadido por essas células, com predomínio das polimorfonucleares. Estas células, entretanto, diminuem sensivelmente a partir de 48 horas após o ato

operatório, passando o exsudato a ser constituído predominantemente por macrófagos. Os fibroblastos do tecido conjuntivo das bordas da lesão tornam-se ativados, proliferam e migram em direção ao coágulo em reabsorção, passando a sintetizar os componentes da matriz extracelular. Segue-se a proliferação endotelial, com formação de tecido conjuntivo vascularizado no local da incisão cirúrgica primitiva (Pereira, 1993).

Em 1842, Lucien Boyer¹ *apud* Ingram (1965) mostrou que um músculo que fora tenotomizado tornara-se aderido à esclera e, 90 anos mais tarde, Carrol e Blake em 1932 estudaram o processo de cicatrização após o retrocesso e ressecção de músculos extra-oculares em coelhos. Seus achados mostraram que, entre 10 e 14 dias após a operação nos animais, o músculo encontrava-se firmemente aderido à esclera.

Em 1965, Ingram publicou trabalho abordando a reparação tecidual após cirurgias de retrocesso e ressecção de músculos extra-oculares realizadas em coelhos. O olho direito de cada animal foi usado em todos os casos. O método incluía a remoção dos olhos de forma seqüenciada (0, 1°, 2°, 4°, 5°, 7°, 10°, 14°, 21°, 28°, 56° e 84° dias) para estudo histológico. As conclusões obtidas conduzem à idéia de que o local de reinserção do músculo à esclera depende da capacidade de regeneração dos tecidos; sugere que a hemorragia seja um fator de interferência na cicatrização, atuando de maneira a favorecer a regeneração muscular e

¹ Boyer L. Recherches sur l' operation du strabisme. Germer-Baillière, Paris. 1842. Boyer, Lucien A.H. Recherches sur l'operation du strabisme. - Mémoire présenté à l'Académie des Sciences. Paris, Au Bureau de la Lancette Française, 1842. Relié à la suite et du même auteur - Recherches sur l'Opération du Strabisme. Deuxième Mémoire - Paris, Au Bureau de la Lancette Française, 1844 - 2 mémoires reliés en un in-8° demi-chagrin, 320 et 114 pp. - 12 planches hors-texte gravées - *Travail fondateur sur l'opération du strabisme.*

sua migração em direção ao limbo. Uma vez que haja tecido fibrótico depositado ao redor da ferida, pode ocorrer facilitação ou obstrução a esse processo.

Inúmeros processos bioquímicos, de alta complexidade, estão envolvidos na patogênese das aderências (Figura 1). Em resposta ao intenso traumatismo cirúrgico, vários agentes extremamente reativos são liberados, incluindo as citocinas, metabólitos do ácido aracdônico, radicais livres e fatores de crescimento. Holmdahl, da Universidade de Gotemburgo - Suécia, *apud* Jack (1998) destaca a necessidade da compreensão dos mecanismos bioquímicos da cicatrização e da fisiopatologia das aderências, para o desenvolvimento de eficientes mecanismos de tratamento.

Figura 1 - Esquema simplificado da Patogênese das Aderências decorrentes de um traumatismo. O organismo, em frações de segundos, reage com produção de mediadores químicos, que, direta ou indiretamente, geram a reação inflamatória e cicatricial [adaptado de Jack (1998)]

Holmdahl *apud* Jack (1998) destaca a importância do equilíbrio entre a formação de fibrina e a fibrinólise e sugere o uso do ativador plasminogênico tecidual como encorajador para a sua obtenção.

Outros caminhos para a prevenção das aderências são tentados. Um dos mais simples é evitar o uso de luvas cirúrgicas com talco ou amido e evitar esfregar hastes de celulose flexível com algodão nas extremidades (cotonete[®]) na ferida cirúrgica (Jack, 1998).

A cirurgia do estrabismo complicado por aderências é sempre difícil e as realizadas para eliminá-las, usualmente, criam novas dificuldades (Dunlap, 1974). Brown, por meio de comunicação pessoal a Dunlap (1974), postulou que, uma vez existentes, as aderências não podem ser totalmente eliminadas e sua recorrência não pode ser completamente prevenida.

Também, a rotineira cirurgia de estrabismo pode gerar aderências na área manipulada, o que pode resultar em maior dificuldade nas operações subseqüentes. Assim, contribuições mecânicas para o sucesso da cirurgia de estrabismo incluem os cuidados para evitar a formação de excessivo tecido fibrótico (Hertle *et al.*, 1993).

As Aderências podem ocorrer em vários locais:

- a) Entre o ventre muscular ou seu tendão e o bulbo ocular.
- b) Entre o músculo ou sua bainha e a conjuntiva suprajacente.
- c) Entre a esclera ou a membrana intermuscular e a conjuntiva.

Difusas camadas de tecido cicatricial podem envolver amplas áreas de músculo, cápsula, tecido intermuscular e conjuntiva, fundindo-se em uma única massa (Dunlap, 1974).

A partir de 1980, as substâncias viscoelásticas foram introduzidas nos procedimentos oftalmológicos. Estas substâncias têm quatro propriedades físicas fundamentais: viscosidade, elasticidade, pseudoplasticidade e tensão superficial. Além disso, os viscoelásticos podem agrupar-se, de acordo com seu comportamento dinâmico, em coesivos e dispersivos. A viscosidade define-se como resistência ao movimento. Esta função depende do peso molecular e do tamanho das partículas e permite que estas substâncias sejam úteis para restaurar, formar e manter espaços, o que possibilita absorver forças de compressão e proteger os tecidos oculares. A elasticidade é a capacidade de recuperar a forma original após uma deformação. A pseudoplasticidade consiste na capacidade de uma substância transformar-se de gel a líquido, ou seja, a mudança da viscosidade dependendo da fricção aplicada (Cartier, 2000).

O Hialuronato de Sódio é um bipolímero, dissacárido, obtido de fontes naturais (crista de galo) ou mediante fermentação bacteriana. Foi o primeiro viscoelástico disponível. Uma de suas características mais importantes é seu comportamento altamente pseudoplástico. A viscosidade desta substância incrementa-se de forma exponencial à medida que aumenta sua concentração. Sua principal utilidade clínica é a grande capacidade de proteção endotelial (Cartier, 2000). Baseado nas características descritas acima, Oh e Lee (1992) utilizaram o hialuronato de sódio e o acetato de triancinolona na tentativa de reduzir as aderências após cirurgia de estrabismo. Para tanto, utilizaram modelo animal de experimentação. Coelhos foram submetidos a moderado traumatismo cirúrgico em um

músculo reto superior e a intenso traumatismo no outro músculo reto superior. Os animais foram divididos em três grupos: grupo controle, grupo de animais que tiveram os tecidos circunjacentes ao local da cirurgia recobertos por hialuronato de sódio e grupo de animais que foram submetidos à injeção subconjuntival de triancinolona acetona. A intensidade das aderências foi graduada de acordo com a exploração cirúrgica dos locais previamente manipulados e a comparação histológica realizada após quatro semanas do ato cirúrgico. Os dados obtidos revelaram redução significativa das aderências no grupo de animais em que se utilizou o hialuronato de sódio, em comparação com os animais do grupo controle, sob condições de intenso traumatismo cirúrgico; contudo, os animais em que se injetou a triancinolona não apresentaram diferença significativa ao se comparar com aqueles do grupo controle.

Na cirurgia estrabológica, em especial nas reoperações ou nos casos decorrentes de traumatismo, o emprego de barreiras mecânicas (Dunlap, 1974; Clorfeine e Parker, 1987; Searl *et al.*, 1987; Elsas *et al.*, 1992; Shokida, 1993; Hwang e Chang, 1996a, 1996b, 1997 e 1999) tem por finalidade inserir obstáculos à formação inadequada de cicatriz cirúrgica.

A cirurgia de estrabismo pode falhar devido a mudanças no ângulo de desvio, o que, por vezes, ocorre poucos dias após a cirurgia. Em 1993, Shokida publicou trabalho em que empregou uma fina lâmina de silicone entre o músculo e a esclera, como recurso para prevenir aderências entre esses tecidos, permitindo ajuste tardio da sutura. Uma vez realizado o procedimento, a lâmina era removida.

Outra barreira utilizada com a mesma finalidade é o Seprafilm[®]. Trata-se de membrana bioabsorvível, composta de Hialuronato de Sódio e Carboximetilcelulose. De uso freqüente nas cirurgias abdominais, o Seprafilm[®] foi empregado por Assaf em 1999, o qual relatou boa tolerância ao uso em quatro pacientes com aderências prévias aos tecidos oculares. Em 2004, Özkan *et al.* estudaram o efeito do Seprafilm[®] como modulador da resposta cicatricial. Realizaram ressecção do músculo reto superior de coelhos albinos, com posterior avaliação histopatológica do bulbo ocular e do músculo operado. Os resultados obtidos foram menor presença de fibrose nos animais em que o Seprafilm[®] foi empregado e resposta inflamatória equivalente àqueles em que esteve ausente.

Recentemente, um gel consistindo de um éster poliglicano em matriz gelatinosa (ADCON-L[®]; Gliatech Inc, Cleveland OH, USA) foi usado para minimizar as aderências após cirurgia espinal (Jack, 1998). ADCON-L[®] funciona como barreira para os fibroblastos. É biodegradável, não incita reações inflamatórias e desaparece completamente em três semanas (Einhaus *et al.*, 1997). Tem sido altamente efetivo na redução cicatricial após a laminectomia com modelo de discectomia. A eficiência do ADCON-L[®] também tem sido comprovada em achados clínicos, principalmente em países europeus, da Oceania e América do Norte (Einhaus *et al.*, 1997). Esse produto, contudo, não havia sido testado em casos envolvendo estrabismo, até a pesquisa conduzida por Choi *et al.*, em 2001. Esses autores utilizaram dezesseis coelhos, de ambos os sexos, com peso variando entre 2,0 e 2,5 kg. Os animais foram submetidos a retrocesso do músculo reto superior

binocularmente. Cerca de 1 cc de ADCON-L[®] foi aplicado ao redor do músculo operado no olho direito e a mesma quantidade de solução salina balanceada foi empregada no olho esquerdo. Foi utilizada sutura ajustável, que permitiu ajustes no quarto e sétimo dias. As manobras realizadas para o ajuste das suturas foram monitoradas por aparelhos de tensão, o que permitiu medir a força empregada para cada situação. Embora os resultados indicassem menor aderência nos casos em que se utilizou o ADCON-L[®], não houve comprovação estatística desse fato.

Além das barreiras mecânicas, o arsenal terapêutico inclui várias substâncias farmacologicamente ativas para a inibição do processo inflamatório, que representam recursos valiosos para minimizar e inibir a formação de restrições aos movimentos oculares.

O emprego do 5-Fluororacil (5-FU) como agente anti-fibroblástico foi proposto por Andreo *et al.* em 1997. Esses autores realizaram retrocessos dos músculos reto superior e reto inferior em 10 coelhos da raça Stauffland. Os músculos operados em um olho receberam, por 5 minutos, aplicação tópica de solução de 5-FU na concentração de 50 mg/cc. Os olhos contra-laterais receberam tratamento placebo, com a aplicação de solução salina aplicada também por cinco minutos. Após 29 dias da cirurgia, as órbitas foram exenteradas e os locais das novas inserções musculares examinados para evidenciar a cicatrização. A resistência ao estiramento dos músculos foi medida. Outros dois coelhos que não foram operados, mas tiveram suas órbitas exenteradas e os olhos e anexos musculares examinados, serviram como controle. Os resultados revelaram significativa redução da cicatrização nos

olhos tratados com 5-FU. A redução da resistência ao estiramento foi comparada entre os três grupos, com significativa redução nos olhos tratados com 5-FU.

A Mitomicina C (MMC) é um agente antimetabólico isolado a partir do *Streptomyces caespitosus*. Seletivamente, inibe a biosíntese do ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) celular, proteínas e também a proliferação de fibroblastos (Mahindrakar *et al.*, 2001). Tem sido testada experimentalmente para reduzir as aderências resultantes da cirurgia de estrabismo (Urban e Kaufman, 1994; Cruz e Matkovich, 1995; Brooks *et al.* 1996; Ohtsuki *et al.*, 1997).

A análise dos trabalhos supracitados revela resultados divergentes. Cruz (1996) relata redução da formação de cicatriz e aderências pós-operatórias ao usar a MMC na concentração de 0,2 mg/cc. Mahindrakar *et al.* (2001) utilizaram a MMC na mesma concentração, aplicada por cinco minutos sobre a esclera adjacente ao músculo retrocedido, e encontraram redução na formação de aderências nos estrabismos restritivos, além de boa tolerância clínica dos pacientes. Em contraste, Brooks *et al.* (1996) não encontraram redução significativa na cicatrização e restrição da mobilidade ocular com MMC. Similarmente, Ohtsuki *et al.* (1997) comprovaram a ineficácia da MMC na prevenção da migração muscular, resultante de suposta vigorosa resposta cicatricial. A polêmica persiste, pois ainda recentemente Esme *et al.* (2004) demonstraram a efetividade desse tipo de droga para o tratamento cirúrgico do estrabismo.

Em nosso meio, merece destaque a pesquisa desenvolvida por Minguini *et al.* (2000) cujo desenho experimental consistia em uma pesquisa

prospectiva e mascarada realizada em dois estádios, envolvendo coelhos brancos da Nova Zelândia. O modelo animal, desenvolvido para medida da resposta inflamatória, foi utilizado com o intuito de potencializar a reposta tecidual, mediante cauterização de 1cm² da esclera subjacente à superfície ventral do músculo reto inferior (RI). O segundo estágio envolveu o retrocesso bilateral do RI e a subsequente aplicação aleatória de solução salina e da MMC (0,4 mg/cc), durante três minutos, entre o músculo operado e a esclera cauterizada. Após sete semanas, as órbitas foram exenteradas e o material obtido encaminhado para análise histopatológica. Procederam-se três cortes sagitais perpendiculares à área de inserção muscular pós-cirúrgica, com posterior coloração com tricromo de Masson e estimativa da intensidade da resposta inflamatória feita pelo somatório das áreas de cada granuloma. A área do granuloma foi determinada usando-se a fórmula da área da elipse:

$$A = \pi (a \cdot b)$$

Onde:

a = maior diâmetro

b = menor diâmetro

A análise estatística não suporta a hipótese de que a MMC seja efetiva na redução pós-operatória da cicatrização resultante da cirurgia de estrabismo em coelhos. Contudo, não há conclusões sobre a atuação da droga sobre os tecidos adjacentes.

Na linha de pesquisa que estuda a ação de drogas inibitórias da proliferação de fibroblastos, destaca-se a substância conhecida como Daunorubicina. Essa medicação, na concentração de 0,02%, foi empregada

em 24 pacientes submetidos à reoperação de estrabismo, com satisfatórios resultados preliminares no alinhamento ocular (Dadeya *et al.* 2002).

A utilização de drogas antiinflamatórias hormonais e não hormonais (AINH) na oftalmologia é ainda objeto de investigação. Na área do estrabismo, essa prática é ainda mais controversa, com ausência de conduta normativa.

Corticosteróides são freqüentemente prescritos após cirurgia de estrabismo, conduta esta adotada por Campolattaro *et al.* (2001). Entretanto, o uso de corticosteróides tópicos está associado a diversos efeitos adversos, como aumento da pressão intra-ocular, diminuição da resistência a infecções, formação de catarata e retardo na cicatrização das feridas (Havener, 1983; Ohji *et al.*, 1991; Fraunfelder e Grove, 1996).

Em 1991, Ohji *et al.* examinaram 33 crianças submetidas à cirurgia de estrabismo e evidenciaram aumento da pressão intra-ocular nas que receberam três gotas ao dia de colírio de dexametasona a 0,1%, mas fizeram a ressalva de que a totalidade dos pacientes que receberam fluorometolona a 0,1% permaneceu sem alterações dos níveis pressóricos. No ano de 2000, Chipont e Garcia-Hermosa publicaram interessante trabalho questionando o uso de esteróides após a cirurgia de estrabismo. Ainda nesse mesmo ano, Tripathi e Marsh (2000) encaminharam carta aos editores do Journal of Pediatric Ophthalmology & Strabismus comentando o citado artigo e destacaram situações, como a cirurgia de estrabismo, nas quais o efeito antiinflamatório é desejável na superfície ocular; portanto, o uso de medicações mais fracas, como a fluorometolona, é usualmente eficiente.

Para superar esses problemas, pesquisadores têm investigado as drogas antiinflamatórias não esteróides e têm encontrado equivalente eficácia após cirurgia de catarata e estrabismo (Havener, 1983; Fraunfelder e Grove, 1996). Além disso, os antiinflamatórios não hormonais promovem a redução da dor no período pós-operatório, sem impedimento da cicatrização da ferida cirúrgica. O mecanismo de ação dessas drogas baseia-se na redução da síntese das prostaglandinas pela inibição da atividade da ciclooxigenase. A ciclooxigenase catalisa a formação de endoperóxidos, precursores das prostaglandinas, pelo ácido aracdônico (Dadeya *et al.*, 2002).

Wright *et al.*, em 1997 e Apt *et al.*, em 1998, publicaram estudos com diclofenaco de sódio utilizado após cirurgia de duplo recuo dos músculos retos mediais, que atestam eficácia nessas cirurgias simétricas com traumatismo reduzido e menor resposta inflamatória. Todavia, os trabalhos citados não analisaram as cirurgias de recuo-ressecção, que parecem induzir maior resposta inflamatória. Em 2003, Meireles-Teixeira *et al.* publicaram estudo comparativo entre a eficácia do uso de prednisolona e de ceterolaco de trometamina tópicos após cirurgia de estrabismo. Foram selecionados 27 pacientes que se submeteram a recuo-ressecção de retos horizontais em um só olho, sob anestesia tópica, utilizando-se como fio de sutura a poligalactina - Vycril® 6-0 (inclusive na conjuntiva), para tratamento de esotropia ou exotropia, sempre pelo mesmo cirurgião. Do total de pacientes, 15 foram tratados com AINH e 12 com corticóide. Optou-se pelo uso do antibiótico separadamente e não associado a uma das drogas, para que desta forma os grupos variassem entre si apenas pela droga antiinflamatória empregada.

Considerando-se conforto, edema e pressão intra-ocular, não se observou diferença importante entre os dois grupos. Contudo, analisando-se os dados relacionados à hiperemia e formação de granulomas, observou-se menor acometimento nos pacientes em que se utilizou o corticóide.

Desde 1950, os corticosteróides têm sido utilizados com sucesso na redução da morbidade das doenças inflamatórias oculares (Woods, 1950; Olson *et al.*, 1951; Gordon, 1956; Graham e Peyman, 1974).

Os corticosteróides são substâncias usadas para tratamento de doenças inflamatórias de qualquer tecido, incluindo os oculares. A resposta inflamatória imediata (edema, deposição de fibrina, dilatação capilar, migração de leucócitos e fagocitose), assim como os estádios tardios de cicatrização (proliferação capilar, deposição de colágeno e cicatrização) são inibidos por eles. Há inibição da produção de eosinófilos e linfócitos, porém estimulam a eritropoiese e a produção de polimorfonucleares (Goodman *et al.*, 1996).

Os efeitos farmacológicos dos corticosteróides, em razão de suas propriedades glicocorticóides, incluem: estímulo da glicogênese, aumento do depósito de glicogênio no fígado, inibição da utilização da glicose, atividade antiinsulínica, aumento do catabolismo protéico, aumento da lipólise, estímulo à síntese e armazenamento de gordura, aumento da taxa de filtração glomerular, com aumento conseqüente da excreção urinária de urato (a excreção de creatinina permanece inalterada), e aumento da excreção de cálcio (Goodman *et al.*, 1996).

A ação dos corticosteróides na inibição da inflamação ocorre de forma ainda obscura. Supõem-se (International Conference on Glucocorticoid

Hormone Action in Rheumatic Autoimmune Diseases, 1999) que inicialmente a molécula de corticosteróide entra nas células alvo e combina-se com o receptor apropriado no citoplasma. Forma-se, então, um complexo que será transportado para o núcleo celular, alterando a transcrição do DNA. Conseqüentemente, altera-se a produção do RNA mensageiro, a síntese de proteínas e a função celular. A redução da quebra da barreira hemato-retínica é a ação ocular mais conhecida (Mitre, 2004).

Devido aos indesejáveis efeitos colaterais do uso sistêmico dos corticosteróides (alterações eletrolíticas, hiperglicemia, ganho de peso e hipertensão arterial sistêmica), a administração local tem sido preferida quando a terapêutica sistêmica não é indispensável (Mitre, 2004).

Na Oftalmologia, algumas vias de administração local de corticoterapia são utilizadas, como peribulbar, retrobulbar, subconjuntival, subtenoniana e intra-ocular (câmara anterior e cavidade vítrea). A administração periocular, e principalmente a intra-ocular reduzem a necessidade de instilações repetitivas de colírios ou aplicações de pomadas, além de atingir concentrações intra-oculares elevadas (Mitre, 2004).

Em 1997, Thach *et al.* realizaram comparação entre a utilização da corticoterapia retrobulbar e subtenoniana, para o tratamento do edema cistóide macular refratário à medicação tópica. Os pacientes envolvidos nesse estudo haviam recebido medicação tópica hormonal e não hormonal, sem que resultasse melhora clínica. A seguir, foram submetidos a uma única injeção retrobulbar ou a três injeções quinzenais de triancinolona acetônida, na concentração de 40 mg por cc. Interromperam-se o uso de

medicação tópica ao iniciar o tratamento injetável. A melhora da acuidade visual foi o fator de análise mais importante, mostrando-se estatisticamente maior que a obtida com a instilação de colírios e equivalente nos dois tipos de injeção utilizados.

Além das vias de administração, diversas formas de prolongamento do efeito antiinflamatório dos corticóides foram pesquisadas. Tano *et al.*, (1981) apresentaram a utilização, por via intra-ocular, da dexametasona ligada ao álcool. Em comparação com a dexametasona livre, houve maior tempo de permanência (entre sete e quatorze dias, contra três horas da forma livre).

A utilização de poliuretano (copolímero de lactide e glicolide) com liberação sustentável de dexametasona, na cirurgia de estrabismo com ajuste tardio, foi proposta por Kim *et al.* (2004). Nesse estudo, os autores utilizaram o poliuretano como barreira física e como veículo para a liberação gradual da droga. Foram feitos a análise do ajuste (realizado entre quatro e seis semanas após a cirurgia), a avaliação das aderências (sistema de escala de dificuldade) e o exame histológico post mortem, nos animais que receberam o poliuretano sem (grupo controle) e com dexametasona. Ficou evidente a redução da fibrose ao redor do músculo reto superior dos coelhos, nos quais foram utilizados filmes de poliuretano com dexametasona em comparação com os achados do grupo controle. Outro achado importante foi redução das aderências quando se utilizou o filme de poliuretano. Em resumo, um novo sistema de liberação da dexametasona foi apresentado, possibilitando o ajuste tardio (até seis

semanas pós-operatórias) sem a necessidade da freqüente instilação de esteróides (Kim *et al.*, 2004).

Além da dexametasona, outros corticosteróides foram pesquisados. Tano *et al.* (1980a, 1980b e 1981) estudaram a ação da triancinolona acetonida. Verificaram que a triancinolona é insolúvel em água e, portanto, permanece maior tempo no olho do que a dexametasona-álcool. Sua potente ação antiinflamatória foi avaliada ao observar-se significativa redução do descolamento tracional da retina dos coelhos com menor formação de neovascularização neste local. Estimaram que a triancinolona foi vinte e uma vezes mais potente do que a dexametasona-álcool e cerca de trezentos e vinte e cinco vezes mais do que o corticosteróide natural. A ação inibitória do corticosteróide sobre o crescimento fibroblástico é atribuída à ação antiinflamatória e antimitótica nas células (Tano *et al.*, 1980b).

A busca por uma droga que seja eficaz na prevenção e tratamento do processo inflamatório continua a ser um desafio. Em 1994, Domínguez discorreu sobre os dispositivos e medicamentos introduzidos dentro do olho para o tratamento de determinadas doenças. Esse autor descreveu a utilização de 1 mg de triancinolona ao final da realização de vitrectomia. Utilizou triancinolona do laboratório Bristol-Meyers Squibb (Espanha) e a dose empregada foi de 2 mg. Comparando-se com uma mega dose sistêmica de 1.000 mg, a injeção *in situ* de 2 mg (sem levar em conta a penetração relativa, nem a liberação lenta) alcança nível tissular intra-ocular vinte vezes maior, enquanto o nível sistêmico é quinhentas vezes menor.

Ainda sobre os estudos de Domínguez (1994), com narrativa na Academia Nacional de Madrid, há o relato de 34 olhos de 31 enfermos tratados com excelentes resultados. Os casos tratados o foram por edema macular (diversas causas), degeneração disciforme ativa (antes de fotocoagulação), enfermidade de Coats, membranas subretínicas, neurite óptica, coroidopatia peripapilar helicoidal e após vitrectomia e cirurgia de glaucoma. O tratamento realizado permitiu administrar ao olho elevadas doses de esteróides a diabéticos, hipertensos arteriais, pacientes com gastropatias e osteoporose, com escassas precauções, pois a dose sistêmica era mínima. A iatrogenia mais destacada dessa via foi a elevação da pressão intra-ocular, transitória em todos os casos. Dita elevação foi importante em menos de 10% de todos os olhos tratados e moderada em dois terços, constituindo-se em aspecto que deva ser sempre vigiado.

Estudo prospectivo realizado por Finamor *et al.* (2003), na Universidade Federal de São Paulo, avaliou a acuidade visual e mensurou a pressão intra-ocular de 18 pacientes submetidos à injeção subtenoniana posterior de triancinolona acetona (Kenalog® 40 mg - Grupo A) ou acetato de metilprednisolona (Depomedrol® 40 mg - Grupo B). A opção por um ou por outro medicamento foi feita de acordo com a possibilidade de compra deste pelo paciente. Os resultados mostraram grande número de pacientes com aumento da pressão intra-ocular (42%) após a injeção, contudo, tornou-se difícil avaliar se esse aumento ocorreu apenas em virtude da medicação, já que aproximadamente 20% dos pacientes com uveíte podem desenvolver hipertensão ocular durante o curso da doença (Mills *et al.*, 1986). O aumento

da pressão intra-ocular ocorreu no tempo médio de 2,5 semanas após a injeção, com pico de 10 semanas. A pressão máxima foi de 30 mmHg no grupo A e de 28 mm Hg no grupo B. Medicação hipotensora foi introduzida com êxito, quando os níveis pressóricos ultrapassaram 20 mmHg. Em relação à acuidade visual, foi registrada melhora em 92% dos pacientes, em tempo médio de três semanas, independentemente do corticosteróide utilizado.

Alerta para o uso da triancinolona acetonida em crianças foi feito por Finamor *et al.* (2003), com o relato de três pacientes portadores de uveíte intermediária que apresentaram elevação importante da pressão intra-ocular refratária ao uso de medicação anti-hipertensiva.

Recente publicação de Zajdenweber *et al.* (2006) mostrou série de 24 pacientes (26 olhos) que receberam injeção subtenoniana de 1 cc de triancinolona acetonida (Kenalog[®] 40 mg) para tratamento de inflamação intra-ocular. Foram medidas a acuidade visual (tabela de Snellen) e a pressão intra-ocular nos dias 1, 7, 30, 90 e 180. Todos os pacientes receberam injeção única de triancinolona acetonida, sendo que dois pacientes se submeteram a injeção não simultânea em ambos os olhos. Nesse estudo, não foi observado aumento significativo da pressão intra-ocular, fato atribuído pelos autores ao uso profilático de colírio anti-hipertensivo (maleato de timolol 0,5%). Esse dado adquire maior relevância devido ao período de seis meses de acompanhamento desses pacientes.

Apesar da baixa incidência de reações adversas a essas medicações e de seus benefícios em relação à função visual, injeções subtenonianas de

corticóide podem resultar em aumento da pressão intra-ocular em alguns pacientes. A sensibilidade aumentada ao uso de corticóide é encontrada principalmente em pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto, mas outras condições como diabetes, alta miopia, história familiar e algumas doenças do tecido conectivo representam fatores de risco para o desenvolvimento de glaucoma corticogênico (Mueller *et al.*, 1998).

Em que pese o eventual aumento da pressão intra-ocular, a utilização da triancinolona é um recurso terapêutico a ser considerado. Merece destaque a propriedade de inibição do desenvolvimento de neovascularização por meio da inibição da proliferação fibroblástica no olho (Nguyen e Lee, 1992) e da resposta neovascular e fibroproliferativa, no modelo desenvolvido em coelhos com retinopatia vitreoproliferativa (Tano *et al.*, 1980a e 1980b; Antoszyk *et al.*, 1993). Trabalhos subsequêntes corroboram as investigações prévias que propõem o uso da triancinolona acetônida como potencial tratamento de doenças como as membranas neovasculares coroidéias em humanos (Danis *et al.* 1996; Ciulla *et al.* 2001; Jonas *et al.*, 2003).

Atualmente, a triancinolona injetável é comercializada sob a forma de triancinolona acetônida (Mosby's Drug Consult, 2005). O nome químico para a triancinolona acetônida é 9-fluoro-11,16,17,21-tetrahidroxi-pregna-1,4-diene-3,20-dione cíclico 16,17-acetal com acetona. Seu peso molecular é de 434,50u.

No mercado americano, a triancinolona é encontrada sob o nome comercial de Kenalog[®], fabricado pelo laboratório Bristol-Myers Squibb, e disponível para uso na forma de suspensão. A injeção de Kenalog-40[®] provê

um corticosteróide sintético com marcada ação antiinflamatória. Cada centímetro cúbico de suspensão aquosa estéril contém 40 mg de triancinolona acetonida, com cloreto de sódio para isotonicidade, 0,99% de álcool benzílico adicionado como preservante, 0,75% de carboximetilcelulose de sódio e 0,04% polisorbato 80; hidróxido de sódio ou ácido hidrocloreico podem estar presentes para ajustar o pH para valores entre 5,0 e 7,5. No momento da manufatura, o ar presente no frasco é substituído por nitrogênio. No Brasil, há manipulação magistral do mesmo composto da triancinolona, sem o preservante, na concentração de 40mg/cc pela Ophthalmos Indústria Farmacêutica.

2 OBJETIVOS

Considerando-se a importância das informações sobre a resposta inflamatória e cicatricial decorrente da cirurgia de estrabismo e atentando-se para a escassez e variabilidade de dados na literatura referentes aos efeitos da triancinolona acetonida sobre olhos, tem o presente estudo o objetivo de avaliar a ação desse medicamento na resposta inflamatória de coelhos submetidos a retrocesso do músculo reto superior. Para tanto, formularam-se as seguintes questões:

a) Há correlação entre a substância utilizada (triancinolona acetonida e solução de cloreto de sódio a 0,9%) e os resultados da análise histológica qualitativa? Caso haja correlação, existem diferenças entre os grupos de estudo e o grupo controle?

b) Há correlação entre a substância utilizada (triancinolona acetonida e solução de cloreto de sódio a 0,9%) e os resultados da análise histológica quantitativa (morfometria das reações granulomatóides)? Caso haja correlação, existem diferenças entre os grupos de estudo e o grupo controle?

c) Há correlação entre os resultados da análise histológica qualitativa e a quantitativa?

d) Há correlação entre o peso dos coelhos e os resultados da análise histológica qualitativa e a quantitativa?

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

Realizou-se estudo experimental, analítico, prospectivo, aleatório e mascarado, conduzido em coelhos albinos da linhagem Nova Zelândia, com finalidade de avaliar a utilização da triancinolona acetonida como agente modulador da resposta inflamatória e cicatricial na cirurgia de músculo extra-ocular, mediante método qualitativo e descritivo quantitativo.

3.2 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos aos quais os animais foram submetidos foram aprovados previamente por meio de revisão do protocolo de pesquisa, em reunião da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e com aquiescência da Comissão de Ética para Análise de Projetos e Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexos A e B). Foram seguidos os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais (COBEA) e da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) dos Estados Unidos da América do Norte.

3.3 Estimativa do Tamanho e Poder da Amostra

Para calcular o tamanho e o poder da amostra estudada, utilizaram-se dois programas de computador: *Power and Sample Size Calculation* versão 1.0.13, da *Universidade Vanderbilt*, Estados Unidos da América e *Statistical Power Analysis*. Considerou-se nível de significância estatístico de 95% ($p < 0,05\%$), erro α (risco de rejeitar a hipótese nula H_0 , quando ela for verdadeira) de 0,05 e erro β (risco de aceitar a hipótese nula H_0 , quando ela for falsa) de 0,01%. Usando o método descrito por Hulley e Cummings (1988) por intermédio do programa *Statistical Power Analysis* e observando as variáveis mencionadas acima, seriam necessários 30 olhos.

3.4 Identificação dos Animais

A identificação dos coelhos foi feita de forma numérica, com tinta insolúvel em água, em região depilada da parte interna da orelha direita. A mesma identificação, acrescida da data da cirurgia, foi afixada na gaiola de cada animal.

3.5 Anestesia

A anestesia geral foi realizada com injeção intramuscular de uma mistura de cloridrato de cetamina (Ketalar® - Parke Davis - 20 mg/cc), na dose de 25 mg/kg de peso e solução aquosa a 2% de 2-(2,6-xilidino)-

5,6 dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompum[®] - Bayer - 7 mg/cc) na dose de 5 mg/kg. Para analgesia ocular, foram instiladas, seqüencialmente, duas gotas de colírio de cloridrato de proximetacaína tópica (Anestalcon[®] - Alcon - 0,5%).

3.6 Técnica Operatória

Realizou-se incisão conjuntival entre os locais análogos a 11 e 2 horas; dissecaram-se os ligamentos intermusculares e as demais conexões entre a bainha muscular e a cápsula de **Tenon**. Introduziu-se o gancho de estrabismo para preensão do músculo reto superior e, a seguir, prendeu-se o corpo muscular com pinça de **Jameson**. Isolou-se o músculo oblíquo superior, que foi desinserido, e nele feita miectomia ampla, permitindo que o músculo se afastasse da inserção e não interviesse na reinserção do músculo reto superior. Anatomicamente o oblíquo superior encontra-se inserido atrás da inserção do reto superior, abaixo da sua bainha e aderido a ela. Posteriormente, desinseriu-se o músculo reto superior por meio de tesoura. Utilizou-se fio, com duas agulhas, de polyglactina (Vicryl[®] 6-0 / código 544 / Ethicon[®]), que transpassou a esclera posteriormente ao local de inserção original com pontos de ancoragem nos pólos medial e lateral da extremidade do músculo. A sutura músculo-escleral foi realizada 2 mm posteriormente à inserção original, mantendo-se o alinhamento. A conjuntiva foi fechada com dois pontos isolados do mesmo tipo de Vicryl[®].

3.7 Preparação e Aplicação da Triancinolona Acetonida e da Solução de Cloreto de Sódio a 0,9% (Solução Salina)

Fez-se uso da triancinolona acetonida (denominação comum brasileira), resultado da reação da Triancinolona com a Acetona (TRI). Produzido pela Ophthalmos Indústria Farmacêutica, esse produto foi preparado na concentração de 40 mg/cc, com volume total de 1cc. A droga veio acondicionada em frasco estéril. Cada centímetro cúbico de suspensão aquosa estéril continha 40 mg de triancinolona acetonida, com cloreto de sódio para isotonicidade, 0,75% de carboximetilcelulose de sódio e 0,04% polisorbato 80; esteve presente, quando necessário, hidróxido de sódio ou ácido hidrocloreto para ajustar o pH para valores entre 5,0 a 7,5. Desta solução, após agitar-se o frasco, retirou-se 0,15 cc, que foram distribuídos entre a face ventral do músculo reto superior e a esclera subjacente e entre o músculo e a bainha dorsal e os tecidos adjacentes.

A solução salina escolhida foi o Soro Fisiológico (SAL) fabricado pela Áster Produtos Médicos. É uma solução isotônica (pH = 6,0) em relação aos líquidos corporais que contem 0,9%, em massa, de NaCl (Cloreto de Sódio) em água destilada, ou seja, cada 100cc da solução aquosa contem 0,9 g do sal.

A escolha da substância (TRI ou SAL) a ser aplicada ocorreu de forma aleatória, por meio do arremesso de uma moeda. A face com a “cara” determinava a aplicação de triancinolona no olho direito e do soro fisiológico no olho contralateral; a face com o valor, “coroa”, invertia essa situação.

As aplicações tópicas foram feitas com o músculo isolado e reinserido no local programado, utilizando-se seringa de insulina e cânula de hidrodissecção e hidrodelineação modelo 3424 (Figura 2) com 25g, 7mm de comprimento e ponta achatada (Sharpoint[®], Estados Unidos da América do Norte), permitindo-se introdução suave e melhor distribuição do fluido.

Figura 2 - Cânula Sharpoint[®] modelo 3424 (Imagem divulgada pelo fabricante)

3.8 Estudo Piloto

Para testar o método a ser empregado, foram realizadas as cirurgias em dois grupos de cinco coelhos:

Grupo A:

Retrocesso do músculo reto superior (**RS**), sem cauterização e minimamente traumatizante, com exenteração das órbitas após 15 dias (Anexo C).

Grupo B

Retrocesso do músculo reto superior sem cauterização e minimamente traumatizante, com exenteração das órbitas após 30 dias (Anexo D).

Realizou-se o retrocesso de 2,0 mm do RS em ambos os olhos dos animais de estudo. Empregou-se a triancinolona acetonida em um dos olhos e solução salina no outro. Após 15 dias, as órbitas dos animais do grupo A foram exenteradas e submetidas à análise histológica. O mesmo procedimento foi feito, após 30 dias, com os animais do grupo B.

3.9 Exenteração

Após o prazo estabelecido para a retirada dos olhos e anexos, os animais foram sacrificados com dose letal endovenosa de pentobarbital (100 mg/kg).

3.10 Análise Histológica

Após a exenteração das órbitas (Figura 3), os olhos e anexos musculares foram embebidos em formol tamponado a 10% por 48 horas, sendo posteriormente fixados em parafina.

Figura 3 - Aspecto do bulbo ocular imediatamente após a exenteração da órbita

Depois desse período, procedeu-se à confecção de três cortes sagitais e consecutivos realizados na área que envolveu o limbo superior até o local de inserção pós-cirúrgica do reto superior, incluindo-o completamente. Em seguida, adotou-se a seguinte rotina:

- Desidratação em solução de álcool com concentrações crescentes de 70% até absoluto.
- Clareamento (diafanização) com xilol.
- Inclusão em parafina.
- Secção com micrótomo em cortes de cinco micrômetros.
- Colocação das secções em lâminas.
- Desparafinização.
- Reidratação em soluções de álcool com concentrações decrescentes de soluto até 70%.

- Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) e com Tricromo de Masson (TM).
- Montagem com lamínula e Entelan (reagente para fixação de lâmina).
- Escolha das duas melhores lâminas para a realização da análise histológica.

Os cortes foram examinados por um patologista que desconhecia o tipo de substância aplicada (TRI ou SAL), e a análise das lâminas foi realizada com fotomicroscópio Zeiss III (Carl Zeiss, Alemanha).

Procedeu-se à leitura das lâminas com base no tipo de células encontradas no tecido conjuntivo (von Hertwig *et al.*, 1999; Soncini da Rosa *et al.*, 2002; Weiss *et al.* 2004; Brito *et al.* 2005) o que motivou a análise qualitativa utilizada.

Definiu-se que:

- 0:** Infiltrado inflamatório ausente = ausência de proliferação fibrosa (Figura 4).
- 1:** Infiltrado inflamatório discreto = predomínio de linfócitos / pequena área de fibrose (Figura 5).
- 2:** Infiltrado inflamatório moderado = predomínio de linfócitos, plasmócitos e esparsos macrófagos / moderada área de fibrose (Figura 6).
- 3:** Infiltrado inflamatório intenso = presença de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos / presença de áreas de necrose / extensa área de fibrose (Figura 7).

Ao término dos períodos estabelecidos e em virtude de não se ter evidenciado reação inflamatória e conseqüente fibrose cicatricial, adotou-se o modelo proposto por Minguini *et al.* (2000), que introduziram a cauterização de 1 cm² do leito escleral subjacente à nova inserção muscular como forma de incrementar o traumatismo resultante do ato operatório (Figura 8). Para tanto, utilizou-se o bisturi eletrônico BP-150 (Figura 9), fabricado pela indústria Emai (Brasil), na potência de número 3.

Figura 4 - Ausência de infiltrado inflamatório em meio ao tecido muscular (hematoxilina-eosina 50X)

Figura 5 - Infiltrado inflamatório discreto, em meio ao tecido muscular (hematoxilina-eosina 50X)

Figura 6 - Infiltrado inflamatório moderado, em meio ao tecido muscular (hematoxilina eosina 50X)

Figura 7 Infiltrado inflamatório intenso, meio ao tecido muscular (hematoxilina-eosina 50X)

Figura 8 - Visão superior do retrocesso do músculo reto superior após cauterização do leito escleral e sutura

**Figura 9 - Bisturi eletrônico Emai, modelo bp-150
(Imagem disponibilizada pelo fabricante)**

Após a realização da cirurgia proposta, estabeleceu-se o prazo de 15 dias para a exenteração e posterior análise histológica, adotando-se a mesma seqüência de eventos do estudo piloto, acrescentando-se a morfometria como instrumento de análise quantitativa.

3.11 Morfometria

3.11.1 Características do sistema Axioskop 40

O Axioskop 40 (Figura 10) é um aparelho de microscopia óptica, idealizado para atividades de laboratório, ensino e pesquisa, fabricado pela empresa Carl Zeiss®.

Entre suas principais características estão:

- Presença de um ergotubo, que permite posicionar a ocular em ângulo de 20°.
- Tubo com altura ajustável dentro de uma escala de 50 mm, que pode compensar a posição do examinador.
- Condensador universal desprovido de aberrações esféricas e cromáticas, com espectro de magnificação de 1X a 100X.
- Câmara digital AxioCam MR (Carl Zeiss®) com resolução de 1300 x 1030 pixels e 12-bit de digitalização.

- Programa acessório de computador denominado Axiovision 3.1, que permite a aquisição, processamento e controle da imagem de forma automática e interativa. Com ferramenta disponibilizada pelo programa, há condição de realizar medidas como comprimento, área e ângulos, com opção de exportação dos dados obtidos para programas como o Microsoft® Excel (Brasil).

Figura10 - Axioskop 40 (imagem divulgada pelo fabricante)

3.11.2 Método de análise das lâminas

Após prévia parametrização do aparelho, as lâminas foram avaliadas pelo autor e por médicos pertencentes ao Departamento de Morfologia da FCMSC-SP, sem conhecimento da substância utilizada no momento do ato cirúrgico em questão.

O tecido ocular foi avaliado nos diversos campos. Uma vez feita a identificação da reação granulomatóide ao redor do material de sutura (Williams e Williams, 1983), procedeu-se ao registro fotográfico do campo analisado, utilizando-se o aumento de 25X.

O passo seguinte foi a utilização do programa Axiovision 3.1. Por meio desta ferramenta, com um cursor, delimitou-se a área a ser estudada, obtendo-se medidas da ordem de micrômetros quadrados (μm^2).

Para melhor entendimento e observação, o exame era feito antes no OD e depois no OE, verificando-se primeiramente as lâminas coradas com HE e depois com TM (Figuras 11 e 12).

Todas as lâminas foram fotografadas, perfazendo um total de 112 fotos. A quantidade de registros fotográficos foi determinada pela necessidade de mensurar a área total a ser analisada, o que fez, por vezes, com que determinada lâmina fosse fotografada mais de uma vez.

Os dados obtidos foram exportados para o programa Microsoft® Excel (Brasil), de modo a possibilitar o registro e análise dos resultados.

Figura 11 - Área de reação granulomatóide, delimitada pela linha vermelha, ao redor do material de sutura (hematoxilina-eosina 25X)

Figura 12 - Área de reação granulomatóide, delimitada pela linha vermelha, ao redor do material de sutura (Tricromo de Masson 25X)

3.12 Método Estatístico

3.12.1 Estatística descritiva das amostras

Os grupos de olhos submetidos à aplicação de triancinolona e de solução salina foram descritos quanto à média, desvio-padrão e mediana para a área de reação granulomatóide em cada coloração.

Os pesos dos animais foram classificados quanto à média, desvio padrão e mediana.

3.12.2 Estatística analítica ou comparativa dos dados gerais

Foram analisados um fator (tipo de tratamento) e quatro níveis (área de reação granulomatóide, de acordo com a substância aplicada e coloração utilizada), obtendo-se medidas repetidas (Neter *et al.*, 1996). Os níveis do fator foram:

- Solução salina e coloração HE
- Triancinolona e coloração HE
- Solução salina e coloração TM
- Triancinolona e coloração TM

Foram construídos contrastes para comparações entre as seguintes médias:

- Solução salina e coloração HE X Triancinolona e coloração HE
- Solução salina e coloração TM X Triancinolona e coloração TM
- Solução salina e coloração HE X Solução salina e coloração TM
- Triancinolona e coloração HE X Triancinolona e coloração TM

Utilizou-se o método de análise de variância (ANOVA) para comparações entre duas ou mais médias. A ANOVA foi utilizada para verificar se existiam diferenças significativas entre os níveis dos fatores.

Para verificar se a intensidade da reação inflamatória (ausente ou leve; moderada ou intensa) e o tipo de substância utilizada (solução salina e triancinolona) eram independentes, utilizou-se o teste do χ^2 (chi-quadrado).

A dependência entre a área de reação granulomatóide e o peso dos animais foi calculado usando-se coeficientes de correlação de Pearson e expressa por meio da construção de diagramas de dispersão (Bussab e Morettin, 2003).

O nível mínimo de significância estatística empregado em todos os teste aplicados foi de 95% ($p < 0,05$).

Todos os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa de computador SPSS² (acrônimo de Statistical Package for the Social Sciences – 10.0 para Windows[®] pacote estatístico para as ciências sociais) e orientados pelo serviço de estatística disponibilizado no Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

² SPSS Inc, Chicago, IL, EUA

4 RESULTADOS

4.1 Características dos Animais da Amostra

Após a realização do estudo piloto, 16 coelhos albinos da linhagem Nova Zelândia foram submetidos à cirurgia proposta e subsequente aplicação de TRI e SAL. Todos os 32 olhos foram analisados. As medidas do peso dos animais no momento da cirurgia para exenteração das órbitas encontram-se no Quadro 1.

Quadro 1 - Medidas do peso dos animais no momento da cirurgia para exenteração das órbitas. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004

Coelho	Peso (kg)
1	2,4
2	2,7
3	2,5
4	2,0
5	2,5
6	2,6
7	2,6
8	2,7
9	2,8
10	2,5
11	2,4
12	2,7
13	2,3
14	2,9
15	2,5
16	2,4

O Quadro 2 expõe as medidas descritivas para o peso dos coelhos componentes desta amostra.

Quadro 2 - Medidas descritivas para o peso dos coelhos. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004

	Peso (kg)
Média	2,5
Desvio padrão	0,2
Mínimo	2,0
Mediana	2,5
Máximo	2,9
Número de animais	16

4.2 Resultados da Análise Histológica

Os cortes histológicos, provenientes dos olhos e anexos dos coelhos participantes desta amostra, foram submetidos à classificação qualitativa do infiltrado inflamatório presente. Estes resultados são apresentados no Quadro 3.

Quadro 3 - Tipo de infiltrado inflamatório presente nos cortes histológicos segundo a substância aplicada no ato cirúrgico realizado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – 2004

Coelho	Infiltrado inflamatório/SAL	Infiltrado inflamatório/TRI
1	moderado	ausente
2	intenso	ausente
3	moderado	discreto
4	moderado	discreto
5	moderado	discreto
6	moderado	discreto
7	moderado	moderado
8	intenso	moderado
9	discreto	discreto
10	moderado	discreto
11	moderado	discreto
12	moderado	ausente
13	moderado	discreto
14	intenso	moderado
15	moderado	discreto
16	discreto	ausente

SAL - Solução de cloreto de sódio a 0,9%

TRI - Triacilonona acetona (40mg/cc)

O número de coelhos foi relacionado com a intensidade do infiltrado inflamatório presente nos tecidos oculares oriundos dos olhos operados; a respectiva porcentagem também foi calculada, assim como a distribuição de acordo com a substância empregada. Estes dados estão disponíveis na Tabela 1.

Tabela 1 - Número e respectiva porcentagem de animais segundo o tipo de infiltrado inflamatório e a substância aplicada no ato cirúrgico. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – 2004

	Infiltrado inflamatório				
	Ausente n (%)	Discreto n (%)	Moderado n (%)	Intenso n (%)	Total N (%)
SAL	0 (0,00)	2 (12,50)	11 (68,75)	3 (18,75)	16 (100)
TRI	4 (25,00)	9 (56,25)	3 (18,75)	0 (0,00)	16 (100)
Total	4 (12,50)	11 (34,38)	14 (43,75)	3 (9,38)	32 (100)

SAL - Solução de cloreto de sódio a 0,9%

TRI - Triacilonona acetona (40mg/cc)

O número de animais foi redistribuído em duas categorias, de acordo com o tipo do infiltrado inflamatório encontrado pelo patologista no momento da análise.

A finalidade desta redistribuição foi a de possibilitar melhor avaliação estatística por meio do teste do chi-quadrado. A primeira categoria englobou os cortes histológicos que apresentaram infiltrado inflamatório ausente ou discreto, enquanto a segunda englobou os infiltrados moderados ou intensos. A substância aplicada no momento do ato cirúrgico também foi relacionada com essas categorias, e o resultado pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Número e respectiva porcentagem de animais segundo o tipo de infiltrado inflamatório e substância aplicada no ato cirúrgico. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – 2004

	Ausente ou Discreto	Moderado ou Intenso	Total
	n (%)	n (%)	N (%)
SAL	2 (12,50)	14 (87,50)	16 (100)
TRI	13 (81,25)	3 (18,75)	16 (100)
Total	15 (46,9)	3 (53,1)	32 (100)

SAL - Solução de cloreto de sódio a 0,9%

TRI - Triacilonona acetônida (40mg/cc)

Pelo teste do chi-quadrado, observou-se que a intensidade da inflamação é dependente do tipo de substância utilizada ($p < 0,001$). A proporção de infiltrados inflamatórios ausentes ou discretos foi maior para TRI, e a proporção de infiltrados inflamatórios moderados ou intensos foi maior para SAL.

4.3 Resultados da Morfometria da Reação Granulomatóide

A medida das áreas das reações granulomatóides, presentes nos cortes submetidos à coloração HE, encontram-se detalhados no Quadro 4.

Quadro 4 - Área das reações granulomatóides, presentes nos cortes histológicos, submetidos à coloração hematoxilina-eosina. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004

Coelho	Área da reação granulomatóide (μm^2)	
	SAL	TRI
1	348.312,10	157.522,58
2	451.605,25	227.633,60
3	662.138,23	116.418,71
4	74.239,63	43.408,03
5	426.208,85	659.342,85
6	1.239.701,71	204.290,55
7	484.681,36	293.252,83
8	581.736,25	330.657,30
9	266.602,92	107.239,19
10	941.609,04	603.494,41
11	375.230,72	422.880,48
12	599.154,19	474.624,08
13	501.338,02	517.794,53
14	1.459.551,81	605.770,16
15	801.283,90	176.255,53
16	136.384,72	39.239,94

SAL - Solução de cloreto de sódio a 0,9%

TRI - Triacilonona acetona (40mg/cc)

Confrontando-se as áreas de reação granulomatóide encontradas na tabela acima, verifica-se que os coelhos de números 5, 11 e 13 apresentaram maior medida nos olhos em que foi utilizada a TRI.

O perfil individual para a área da reação granulomatóide medida nas lâminas coradas com HE, segundo o tipo de substância utilizada, está exposto no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Perfil individual para a área da reação granulomatóide medida nas lâminas coradas com hematoxilina-eosina, segundo o tipo de substância utilizada. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004

SAL - Solução de cloreto de sódio a 0,9%
TRI - Triacínolona acetônida (40mg/cc)

A área das reações granulomatóides, presentes nos cortes submetidos à coloração HE, encontram-se detalhados no Quadro 5.

Quadro 5 - Área das reações granulomatóides, presentes nos cortes histológicos, submetidos à coloração tricromo de Masson. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004

Área da reação granulomatóide (μm^2)		
Coelho	SAL	TRI
1	467.809,54	104.498,85
2	661.351,66	138.961,16
3	1.085.336,65	108.879,85
4	72.156,62	166.604,72
5	651.307,26	599.358,00
6	1.144.728,36	304.675,28
7	576.244,81	318.529,88
8	502.079,30	329.499,00
9	253.793,52	165.039,55
10	931.245,87	635.433,03
11	555.429,54	397.633,00
12	413.925,77	501.397,32
13	477.759,25	576.141,02
14	1.409.529,95	470.033,58
15	778.393,14	293.140,90
16	136.489,15	41.571,87

SAL - Solução de cloreto de sódio a 0,9%

TRI - Triacilonona acetona (40mg/cc)

Confrontando-se as áreas de reação granulomatóide encontradas na tabela acima, verifica-se que os coelhos de números 4, 12 e 13 apresentaram maior medida nos olhos em que foi utilizada a TRI.

O perfil individual para a área de reação granulomatóide medida nas lâminas coradas com TM, segundo o tipo de substância utilizada, está exposto no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Perfil individual para a área da reação granulomatóide medida nas lâminas coradas com tricromo de Masson, segundo o tipo de substância utilizada. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004

SAL - Solução de cloreto de sódio a 0,9%
TRI - Triacínolona acetônida (40mg/cc)

O perfil médio para a área da reação granulomatóide, segundo o tipo de substância utilizada após a realização do retrocesso do músculo RS, encontra-se no Gráfico 3, com destaque para cada uma das colorações empregadas.

Gráfico 3 - Perfil médio para a área da reação granulomatóide segundo o tipo de substância, em cada coloração utilizada. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004

SAL - Solução de cloreto de sódio a 0,9%
TRI - Triacilonona acetona (40mg/cc)
HE - Hematoxilina-eosina
TM - Tricromo de Masson

Os resultados obtidos para a área da reação granulomatóide, segundo o tipo de substância aplicada durante a realização do ato cirúrgico, podem ser vistos na Tabela 3, que distingue as colorações usadas.

Tabela 3 - Medidas descritivas (em μm^2) para a área de reação granulomatóide segundo o tipo de substância, em razão da coloração utilizada. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004

Coloração		SAL	TRI
HE	Média	584.361	311.242
	Desvio padrão	373.915	209.984
	Mínimo	74.240	39.240
	Mediana	493.010	260.443
	Máximo	1459.552	659.343
TM	Média	632.349	321.961
	Desvio padrão	366.180	192.253
	Mínimo	72.157	41.572
	Mediana	565.837	311.603
	Máximo	1.409.530	635.433
Total	Média	608.355	316.602
	Desvio padrão	364.865	198.115
	Mínimo	72.157	39.240
	Mediana	528.754	298.964
	Máximo	1.459.552	659.343

SAL - Solução de cloreto de sódio a 0,9%

TRI - Triacilonona acetona (40mg/cc)

HE - Hematoxilina-eosina

TM - Tricromo de Masson

Para verificar se as diferenças entre os níveis dos fatores eram significativas, utilizou-se a ANOVA com medidas repetidas. O resultado dessa técnica foi que as médias dos quatro grupos não eram iguais ($p < 0,01$).

O tratamento estatístico dos contrastes também foi feito utilizando-se a ANOVA e, por meio desta técnica, observou-se que:

a) Na coloração HE, a área média da reação granulomatóide para SAL foi maior do que para a TRI ($p = 0,005$).

b) Na coloração TM, a área média da reação granulomatóide para SAL foi maior do que para a TRI ($p = 0,003$).

c) No grupo submetido à aplicação de SAL, a área de reação granulomatóide medida quando se utilizou a coloração TM foi, em média, a mesma que a obtida quando se utilizou a coloração HE ($p = 0,225$).

d) No grupo submetido à aplicação de TRI, a área de reação granulomatóide medida quando se utilizou a coloração TM foi, em média, a mesma que a obtida quando se utilizou a coloração HE ($p = 0,565$).

4.4 Correlações Entre a Análise Histológica e a Morfometria da Reação Granulomatóide

Gráfico 4 - Box plot da área de reação granulomatóide, segundo o grau da inflamação, na coloração hematoxilina-eosina. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004

SAL - Solução de cloreto de sódio a 0,9%
TRI - Triacilonona acetona (40mg/cc)

No Box plot (diagrama de caixas) a barra central corresponde a mediana, os limites da caixa aos percentis 25% e 75% e as barras nos limites inferior e superior aos percentis 10% e 90% respectivamente.

Observa-se, sob a coloração HE, que o infiltrado inflamatório presente nos tecidos provenientes dos olhos em que foi utilizada a TRI classificou-se predominantemente como discreto ou moderado, enquanto nos tecidos provenientes dos olhos em que foi utilizado SAL o infiltrado inflamatório classificou-se, na maioria das vezes, como moderado ou intenso.

O Gráfico 4 também revela que as menores medidas das áreas de reação granulomatóide foram encontradas nas lâminas em que os infiltrados inflamatórios eram menos intensos, enquanto as maiores medidas foram verificadas nas lâminas em que os infiltrados inflamatórios eram mais intensos.

Ao se esquadrinhar o Gráfico 5, verifica-se que sob a coloração TM, as mesmas relações, entre o tipo de infiltrado inflamatório e a área de reação granulomatóide vistas quando se analisaram os tecidos corados com HE, se repetem.

Gráfico 5 - Box plot da área de reação granulomatóide, segundo o grau da inflamação, na coloração tricromo de Masson. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004

SAL - Solução de cloreto de sódio a 0,9%
TRI - Triacínolona acetônida (40mg/cc)

4.5 Correlações Entre o Peso dos Animais e a Morfometria da Reação Granulomatóide

Gráfico 6 - Diagrama de dispersão da área da reação granulomatóide em função do peso dos coelhos, na coloração hematoxilina-eosina. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004

SAL - Solução de cloreto de sódio a 0,9%
TRI - Triacilonona acetônida (40mg/cc)

Gráfico 7 - Diagrama de dispersão da área da reação granulomatóide em função do peso dos coelhos, na coloração tricromo de Masson. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004

SAL - Solução de cloreto de sódio a 0,9%
TRI - Triacilonona acetona (40mg/cc)

Apesar dos Gráficos 6 e 7 sugerirem que os animais mais pesados apresentaram as maiores áreas de reação granulomatóide, os coeficientes de correlação de Pearson não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre essas variáveis (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores dos coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis (peso dos coelhos e área de reação granulomatóide) envolvidas neste estudo

	Peso	Área SAL-HE	Área TRI-HE
Area SAL-HE	0,533 (*)		
Area SAL-TM	0,475	0,916 (**)	
Área TRI-HE	0,276		
Área TRI-TM	0,128		0,938 (**)

p < 0,05; ** p < 0,01*

SAL – Solução de cloreto de sódio a 0,9%

TRI – Triancinolona acetonida

HE – hematoxilina-eosina

TM – tricromo de Masson

5 DISCUSSÃO

5.1 A escolha da Droga

Este estudo foi desenhado para analisar os efeitos da triancinolona acetonida na reação inflamatória e cicatricial decorrente da cirurgia de estrabismo em coelhos.

A escolha da triancinolona ocorreu por ser esta droga pertencente à família dos corticosteróides e, como tal, apresentar propriedades antiinflamatórias e vasoconstritoras. O mecanismo da atividade antiinflamatória dos corticosteróides é em geral incerto; contudo existe o conhecimento da indução das proteínas inibidoras da fosfolipase A2, coletivamente denominadas lipocortinas. Postula-se que essas proteínas controlem potentes mediadores da inflamação, como as prostaglandinas e leucotrienos, inibindo a liberação do importante precursor, que é o ácido araquidônico ($C_{20}H_{32}O_2$). Por sua vez, o ácido araquidônico é liberado pela membrana fosfolipídica através da fosfolipase A2 (Mosby's Drug Consult, 2005).

Muito do que se conhece atualmente da ação dos glicocorticóides sobre os tecidos oculares é fruto das pesquisas conduzidas por Tano e colaboradores (1980a, 1980b, 1981). O modelo de traumatismo perfurante criado por eles em olhos de coelhos permitiu avaliar a ação da dexametasona-álcool, dissolvida em 0,1 cc, na inibição da reação

inflamatória ocular. Primeiro foi feita lesão perfurante na parede ocular de coelhos e, a seguir, injetaram-se 0,1cc de solução salina no humor vítreo dos animais do grupo controle e 1 mg da solução supracitada no sítio equivalente nos animais do grupo de estudo. A observação dos resultados destaca acentuada diminuição da formação de membrana de tecido fibrovascular na ferida no grupo submetido à solução dexametasona-álcool.

Em trabalho posterior, esses mesmos autores estudaram a ação da triancinolona acetona. Injetaram cultura de fibroblastos autólogos no humor vítreo de coelhos e, a seguir, 1 mg de triancinolona. Após 28 dias, constataram redução significativa do descolamento tracional da retina, de 84% para 20% em comparação com o grupo controle, e da neovascularização de 58% para 0%. Esses resultados indicam que a triancinolona acetona inibe significativamente o desenvolvimento do descolamento tracional da retina e a neovascularização. Se essas diferenças de proporção forem comparadas às da dexametasona álcool, a inibição causada é muito maior. O emprego da dexametasona-álcool reduziu a porcentagem de descolamento de retina de 57% para 24% e da neovascularização de 19% para 4%.

Importante destaque merecem os comentários do grupo liderado por Tano (1981). Ao analisarem a permanência das drogas utilizadas nos dois experimentos citados, verificaram maior tempo de ação da triancinolona, em comparação com a dexametasona-álcool. A explicação para tal fato envolve a insolubilidade na água apresentada pela primeira, o que propicia maior contato com as estruturas circunvizinhas ao local da aplicação (no estudo

em questão foram encontrados indícios de triancinolona no humor vítreo até o vigésimo oitavo dia do experimento). É provável que a consequência disso seja a maior potência referida por Ruhmann e Berliner (1967), os quais estimaram que a triancinolona seja vinte e uma vezes mais potente que a dexametasona-álcool e trezentos e vinte cinco vezes mais potente que a corticosterona.

Os dados acima expostos suportam a idéia de que a disponibilidade de uma droga com tal potência e prolongado tempo de ação pode ser muito útil em situações de reação inflamatória iminente, como as reoperações.

Há longa data presente na terapêutica médica diária, o uso e a segurança da triancinolona acetonida não estão devidamente estabelecidos na estrabismologia. Apesar das propriedades antiinflamatórias e da capacidade de inibição da formação de neovascularização reportadas por vários autores (Tano, 1981; Danis *et al.*, 1996; Ciulla *et al.*, 2001), esta droga só foi experimentada na estrabismologia por Oh e Lee, em 1992. Esses autores realizaram retrocessos do músculo reto superior de ambos os olhos de coelhos, impondo a eles traumatismo cirúrgico de grau moderado e intenso. Para a análise, dividiram os animais em três grupos: grupo controle, o grupo em que se utilizou hialuronato de sódio e o grupo em que foi feita a aplicação subconjuntival da triancinolona acetonida. A graduação da intensidade das aderências mediante exploração cirúrgica dos locais antes operados e a comparação histológica após quatro semanas revelaram significativa redução das aderências pós-operatórias no grupo em que se utilizou o hialuronato de sódio em comparação com o grupo controle sob

condições de intenso traumatismo cirúrgico. A mesma análise foi feita entre o grupo que recebeu a TRI e o grupo controle, porém a análise estatística não demonstrou diferença significativa.

A respeito do trabalho supracitado, o que pode parecer em primeira leitura fato desestimulador para o uso da TRI é na realidade um viés, fruto da comparação de tratamentos com mecanismos de ação diferentes. Fez-se a comparação de substâncias que atuam de forma distinta: o hialuronato de sódio age como barreira mecânica contra a formação de aderências, enquanto a triancinolona desempenha papel como droga antiinflamatória. Aliás, a utilização de barreiras mecânicas já foi testada no tratamento do estrabismo (Shokida, 1993; Assaf, 1999; Choi *et al.*, 2001; Özkan *et al.*, 2004), mas, por motivação diversa (incremento da inflamação, equivalência de resultados com o placebo utilizado e falta de comprovação estatística dos resultados) as experiências sucedidas não se estabeleceram como opção prática.

Adicione-se a isso a distinta localização topográfica dos tratamentos propostos por Oh e Lee, em 1992. O hialuronato de sódio foi colocado no leito da nova inserção muscular, enquanto a injeção subconjuntival da triancinolona, ainda que preserve sua ação principal, não a aloca no sítio em questão e assim impossibilita a atuação até a sua completa absorção. Cabe, ainda, destacar que a avaliação das aderências pós-operatórias foi feita mediante a dissecação dos tecidos envolvidos e esteve diretamente associada às observações dos cirurgiões, o que conferiu subjetividade à análise dos dados. A mesma argumentação pode ser utilizada no método de

análise macroscópica da intensidade da proliferação fibrosa, que foi avaliada segundo um sistema de cruzes, no qual “-” representou a ausência de fibrose, “+” a existência de proliferação fibrosa discreta ou moderada e “++” a existência de intensa proliferação fibrosa.

Neste presente estudo, a escolha foi pela aplicação das substâncias envolvidas (TRI e SAL) diretamente na região da nova inserção muscular. A vantagem deste tipo de posicionamento é a entrega, de maneira simples e sob visão direta, das drogas no seu local de ação, permitindo avaliação integral do seu potencial. A equivalência da disposição entre a substância estudada (triancinolona acetona) e a substância controle (solução salina) impede que se instalem vieses que possam interferir na análise proposta como objetivo. Consideram-se duas possibilidades de acontecimento, sucesso ou insucesso da utilização da TRI, sem a possibilidade de que a substância testada possa induzir reação tecidual por presença de corpo estranho, dado que se estabelece com o emprego das barreiras há pouco comentadas.

Devido ao inusitado uso proposto neste estudo, a quantidade de TRI a ser utilizada foi feita de maneira análoga ao que se faz para o uso intra-articular ou intrabursal para pequenas articulações, visto que há similaridade entre o volume dessas estruturas (Mosby's Drug Consult, 2005).

5.2 O Modelo Animal, a Agressão Cirúrgica e Conseqüente Reação Tecidual

A comparação histológica da junção músculo escleral entre coelhos, macacos e o homem mostra que tanto nos macacos como no homem existe um tendão que se estende entre essas estruturas. Nos coelhos, esse tendão não está presente e observa-se que as fibras musculares se fundem diretamente à esclera (Prince, 1964). Parece sensato supor que em decorrência dessa diferença, os achados após a realização de operações de estrabismo não tenham correspondência com os obtidos em seres humanos.

Contudo, ainda tão pouco se conhece sobre a reparação tecidual que, apesar das distintas estruturas envolvidas, soa razoável seguir os passos de Carrol e Blake (1932), os de Ingram (1965), assim como os de Natalie e Kerr (2004) e adotar os coelhos como animais de estudo.

O prazo de 15 dias, estabelecido para a análise dos tecidos oculares dos coelhos neste estudo foi escolhido em conformidade com os relevantes trabalhos de Ingram (1965 e 1966). Os achados histológicos reportados por esse autor confirmam os publicados por Carrol e Blake (1932) e descrevem o início do depósito de novas fibras colágenas no terceiro dia após a cirurgia, além da proliferação fibrosa que acompanha a reinserção muscular a partir do quinto dia. Ainda segundo Ingram (1965), os músculos parecem estar firmemente reinseridos na esclera 10 a 14 dias após a operação.

O zelo em atuar à semelhança do que se faz na rotineira cirurgia de estrabismo, norteou o emprego da técnica cirúrgica e do material de sutura usados neste trabalho. Assim sendo, fez-se o retrocesso do RS em conformidade com o estabelecido por Prieto-Díaz e Souza-Dias (2002),

naturalmente respeitando-se as diferenças anatômicas presentes entre o coelho e o ser humano; também foi dada preferência ao fio bi agulhado de polyglactina (Vicryl® 6-0 / código 544 / Ethicon®), objeto de estudo e análise de vários autores (Estes e Sugar, 1982; Hertle *et al.*, 1993; Moreira *et al.*, 1998a e 1998b) e consagrado na prática cirúrgica (Mohan *et al.*, 2003).

A criação de intenso traumatismo cirúrgico exacerba a resposta inflamatória e é condição necessária à análise das substâncias empregadas para a modulação da resposta cicatricial. Essa observação pode ser feita no trabalho de Oh e Lee (1992), os quais escarificaram a área exposta da superfície superior e inferior do músculo reto superior e da esclera subjacente com bisturi cirúrgico com lâmina número 15, executando dez movimentos para criar uma superfície de tecido cruento.

Analogamente ao que fora feito por Oh e Lee (1992), Minguini *et al.*, (2000), ao estudarem a ação da mitomicina C na cirurgia de estrabismo em coelhos, potencializaram a agressão cirúrgica, introduzindo a cauterização da face ventral do músculo reto superior e da esclera subjacente, em área de 1 cm².

Neste estudo, a série inicial foi realizada da maneira clássica descrita por Prieto-Díaz e Souza-Dias (2002), sem qualquer artifício que pudesse interferir na resposta inflamatória e cicatricial dos animais. A análise dos tecidos envolvidos, músculo reto superior e esclera, revelou resultados similares entre o grupo controle e o grupo de coelhos tratados com a triancinolona. A explicação para isso reside no fato de que a cirurgia de estrabismo, tal como é normalmente realizada, não induz reação inflamatória

suficiente para avaliar a ação das substâncias empregadas para inibi-la. Na segunda série de animais, incorporou-se ao método a cauterização das estruturas envolvidas, de acordo com o que foi realizado por Minguini *et al.*, (2000). Com a reação inflamatória exacerbada, as diferenças entre os grupos de animais ficaram evidenciadas, permitindo, assim, análise dos resultados e posterior estudo estatístico.

Ao avaliar o acima exposto, depreende-se que a utilização da TRI pode justificar-se em ocasiões de intensa manipulação cirúrgica, como cirurgias difíceis, reoperações, cerclagem, etc., substituindo com vantagens os corticosteróides de ação rápida.

5.3 Avaliação da Reação Inflamatória

Para avaliar a reação inflamatória, optou-se por análises qualitativa e quantitativa. Para tanto, os tecidos obtidos dos animais foram encaminhados para análises mascaradas, independentes, realizadas respectivamente por patologista (análise qualitativa) e morfolologista (análise quantitativa). O desconhecimento da droga aplicada no momento da cirurgia conferiu imparcialidade à análise e aos resultados.

Houve preocupação em utilizar-se a melhor técnica para a identificação dos elementos celulares. Sabe-se que a grande maioria das estruturas celulares e teciduais são transparentes, incolores e com índice de refração muito próximo, o que dificulta a observação. Há, portanto, necessidade da utilização de corantes histológicos que evidenciem tais

estruturas. As técnicas procuram associar o caráter básico ou ácido do corante a ser utilizado ao do material a ser evidenciado. Dessa maneira, cria-se o grupamento químico responsável pela cor ou grupamento cromóforo. As moléculas ácidas, como os ácidos nucleicos (DNA e o RNA), por exemplo, são estruturas basófilas. As estruturas ricas em grupamentos básicos, proteínas, por exemplo, são acidófilas, por terem afinidade por corantes ácidos.

A coloração por hematoxilina e eosina é a mais usada na prática médica. A hematoxilina é um corante básico que cora componentes ácidos, como o núcleo, que passa a ser identificado em tom de azul. A eosina é um corante ácido, que cora componentes básicos, como o citoplasma, que passa a ser identificado em intenso tom cor de rosa.

As colorações tricrômicas (Masson) foram concebidas para ser utilizadas principalmente para distinguir o colágeno a partir do tecido muscular. Em geral, essas colorações consistem em corantes nucleares, colágenos e citoplasmáticos em mordentes como, por exemplo, o ácido fosfotúngstico ou ácido fosfomolibdico. Identificam os núcleos em cor preta ou azul, o citoplasma em cor vermelha, as fibras musculares em cor vermelha e o colágeno em cor azul.

As características químicas das colorações utilizadas possibilitaram analisar as diferentes estruturas e processos celulares. Uma vez feita a opção pelas duas técnicas de coloração, destacaram-se os elementos celulares na primeira e as áreas de reação granulomatóide e as estruturas do colágeno na segunda. Vantagem decorrente disso foi a criação de dois

parâmetros de análise, ou seja, o patologista tinha a oportunidade de examinar o mesmo corte corado com HE e TM e, assim, ratificar ou retificar a classificação do infiltrado inflamatório. Isso permitiu que as amostras coradas por HE e TM fossem avaliadas de forma independente, o que minimizou a subjetividade do patologista, pois as amostras teciduais foram revistas para então proceder-se a classificação do infiltrado inflamatório.

Igual situação ocorreu com as medidas das reações granulomatóides. Essas áreas foram delimitadas, sem interdependência, nas duas condições de coloração e geraram dados distintos, que posteriormente foram submetidos à análise estatística.

A análise qualitativa do infiltrado inflamatório presente nos cortes realizados nas áreas de estudo levou em consideração o tipo de células encontradas e a presença de fibrose. Observando-se o Quadro 3 e as Tabelas 1 e 2, verifica-se maior intensidade inflamatória nos olhos do grupo controle, com predomínio de linhagem celular (neutrófilos e macrófagos) típica dos processos mais intensos. Esse parâmetro de análise mostra que o TRI atuou de forma efetiva na redução da resposta inflamatória, com infiltrado de menor intensidade em todos os olhos submetidos à sua ação.

Tal observação ganha maior importância em decorrência do já citado observador mascarado e reforça o conhecimento farmacocinético de que TRI reduz o número de linfócitos circulantes e no local da aplicação (Derendorf *et al.*, 1995). Ratifica-se a clínica farmacológica que aponta o TRI como o mais potente derivado da triancinolona. Embora a triancinolona por

si só seja de uma a duas vezes mais potente que a prednisona em modelos animais de inflamação, o TRI é aproximadamente oito vezes mais potente que a prednisona (Mosby's Drug Consult, 2005).

A presença de fibrose foi fato comum e representou aspecto relevante associado à reação granulomatosa. Embora não tenha havido medida direta da fibrose, as observações feitas a partir da coloração TM sugerem sua proporcionalidade à intensidade do processo inflamatório instalado.

A busca por dados concretos correlacionados à resposta tecidual decorrente da agressão cirúrgica suscitou a criação de métodos quantitativos de análise, realizados de forma objetiva e excluindo-se ao máximo a influência imposta pelo examinador.

Minguini *et al.* (2000) propuseram estimar, de forma semiquantitativa, a área de cada reação granulomatóide verificada ao redor do material de sutura. A ferramenta utilizada foi o uso da fórmula para cálculo da área de uma elipse. Assim, segundo esses autores, seria possível dispor de importante parâmetro. Critica-se, porém, a marcação manual e imprecisa dos locais estipulados como aqueles que delimitaram a forma geométrica escolhida.

Neste trabalho, incorporou-se o princípio proposto por Minguini *et al.* (2000); contudo, a análise da reação granulomatóide foi quantitativa e feita de modo inédito. O emprego do microscópio Zeiss modelo Axioskop 40, acoplado a computador equipado com programa Axionvision 3.1, para delimitação na ordem de micrômetros quadrados, possibilitou mensurar as áreas da reação granulomatóide e conferiu a possibilidade de obtenção

de medidas objetivas. Este fato é deveras importante, principalmente se lembramos que o micrômetro é a milésima parte (0,001 mm) do milímetro.

Simultaneamente à análise das características histológicas dos tecidos presentes no local da nova inserção muscular, realizou-se avaliação da extensão da reação granulomatóide e conseqüente análise estatística, demonstrando-se, nos olhos tratados com triancinolona, redução significativa da área de reação granulomatóide em comparação com os olhos controle.

Mais uma vez a validade do método proposto neste estudo é atestada, pois as diferentes colorações ampliaram o número de amostras e os resultados obtidos mostraram que as medidas das áreas das reações granulomatóides são estatisticamente iguais nos dois tipos de coloração empregados.

A correlação entre o tipo de infiltrado inflamatório e as áreas das reações granulomatóides mostrou-se proporcional, visto que a maior intensidade inflamatória foi verificada nos olhos em que se obtiveram as maiores medidas morfométricas. Esse fato certifica o modo de análise usado, pois mostra por meio de métodos distintos, que os olhos submetidos à aplicação de TRI foram os que apresentaram menor resposta tecidual frente à agressão cirúrgica imposta.

Contudo, ao examinar-se minuciosamente os resultados da morfometria, encontram-se situações de comportamento diferente do que foi descrito até o presente. No Quadro 4, verifica-se que os coelhos de número 5, 11 e 13 tiveram maior área de reação granulomatosa (medida sob HE) nos olhos submetidos ao TRI. Também, no Quadro 5, encontra-se nos coelhos de número 4, 12 e 13 comportamento similar (medida sob TM).

A necessidade de entender o que se passou leva ao exercício da especulação dos motivos causais desses achados. De início, a realização de cortes próximos, mas não coincidentes, pode justificar a diferença da ordem de micrômetros quadrados. Outro possível fato pode ter sido a cauterização, que embora realizada de forma padronizada, poderia causar agressão distinta na área de 1 cm² do leito escleral. Pode-se ainda questionar a resposta individual de cada animal ao fio de sutura, visto que, na análise histológica qualitativa, que retrata mais amplamente a situação, o infiltrado inflamatório dos referidos coelhos foi sempre de maior intensidade nos olhos submetidos a SAL. Por fim, a proximidade presente entre essas medidas não permite conclusão estatisticamente válida.

A confrontação do peso dos coelhos com os resultados obtidos por meio da morfometria foi feita com o objetivo de observar-se a eventual relação entre a intensidade da resposta inflamatória e cicatricial e essa variável. A suposição era de que, quanto mais pesados fossem os animais, maior seria a resposta à agressão cirúrgica imposta a eles. No entanto, embora a análise dos resultados sugira correlação entre essas variáveis (Gráficos 6 e 7), a análise estatística não revelou igualdade significativa (Tabela 4).

6 CONCLUSÕES

Saliente-se que as ilações relacionadas aos achados deste estudo aplicam-se, estatisticamente, à amostra de animais provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

Nas condições de realização do estudo, concluiu-se que:

a) O tipo de infiltrado inflamatório presente nos tecidos analisados, e que retrata a intensidade da inflamação, foi dependente do tipo de substância utilizada ($p < 0,001$). A porcentagem de infiltrados inflamatórios leves ou moderados foi maior nos coelhos em que se aplicou o acetato de triancinolona (81,25%), enquanto a proporção de infiltrados inflamatórios moderados ou intensos foi maior nos coelhos em que se utilizou a solução salina (87,50%).

b) No grupo submetido à aplicação de solução salina, a área da reação granulomatóide medida quando se utilizou a coloração hematoxilina-eosina foi, em média, a mesma que a obtida quando se utilizou a coloração tricromo de Masson ($p = 0,225$).

c) No grupo submetido à aplicação de triancinolona, a área da reação granulomatóide medida quando se utilizou a coloração hematoxilina-eosina foi, em média, a mesma que a obtida quando se utilizou a coloração tricromo de Masson ($p = 0,565$).

d) As áreas das reações granulomatóides presentes nos cortes histológicos, submetidos à coloração hematoxilina-eosina e tricromo de Masson, foram maiores (respectivamente $p = 0,005$ e $p = 0,003$) quando se utilizou a solução salina do que quando se utilizou o acetato de triancinolona.

e) As menores áreas de reação granulomatóide foram encontradas nas lâminas em que os infiltrados inflamatórios foram menos intensos e estiveram relacionadas à aplicação do acetato de triancinolona, enquanto as maiores medidas foram verificadas nas lâminas em que os infiltrados inflamatórios foram mais intensos e estiveram relacionadas à aplicação da solução salina.

f) O peso dos animais componentes da amostra utilizada não apresentou correlação positiva com a dimensão das áreas de reação granulomatóide.

7 ANEXOS

Anexo A - Protocolo de Pesquisa - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

FUNDAÇÃO ARNALDO VIEIRA DE CARVALHO - C.N.P.J.: 62.327.663/0001-72

Utilidade Pública Federal: Decreto nº 62.088 de 09/01/68 - DOU 11/01/68

Utilidade Pública Estadual: Lei nº 3.974 de 20/12/83 - DOE 21/12/83

Utilidade Pública Municipal: Decreto nº 19.725 de 16/05/84 - DOM 24/05/84

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA SANTA CASA DE SÃO PAULO

Reconhecimento: Decreto Federal nº 62.044 de 04/01/68 - DOU 08/01/68

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

PARECER

Ilmo. Senhor(a)

Luis Eduardo Morato Rebouças de Carvalho

Investigador Principal – Protocolo nº. 67

Prezado Senhor(a):

Informamos que o projeto **"Utilização da Triancinolona na Cirurgia Experimental de Estrabismo em Coelhos"** sob sua orientação, se encontra de acordo com as normas de ética para experimentação animal.

Não foram realizadas avaliações técnicas e/ou orçamentárias.

São Paulo, 12 de Março de 2004.

Prof. Dra. Antonia Gladys Nasello

Presidente da CEEA

Rua Dr. Cesário Motta Jr., 61 - CEP: 01221-020 - São Paulo - SP.

Telefones: (011) 223-9922 - Tronco Chave

(011) 222-8649 - Diretoria da Fundação

(011) 220-7288 - Diretoria da Faculdade

**Anexo B - Protocolo de Pesquisa - Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo**

Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo

Ao

DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 04.11.04 tomou conhecimento da execução do Protocolo de Pesquisa nº 906/04 - intitulado "Utilização da Triancinolona na cirurgia de Estrabismo em coelhos".

No que tange a sua parte empírica, será desenvolvido na Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, tendo seu Comitê de Ética aprovado o protocolo em 12.03.04.

Pesquisador(a) Responsável: **PROF. DR. CARLOS ALBERTO RODRIGUES ALVES**

Pesquisador(a) Executante: **DR. LUIS EDUARDO MORATO REBOUÇAS DE CARVALHO**

CAPPesq, 04 de Novembro de 2004.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo C - Descrição dos dados referentes aos animais integrantes do grupo A do estudo piloto. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004

Coelho	Olho	Substância	Colorações	Infiltrado inflamatório	Peso (kg)
1	OD	TRI	HE / TM	discreto	2,4
1	OE	SAL	HE / TM	ausente	2,4
2	OD	TRI	HE / TM	ausente	2,3
2	OE	SAL	HE / TM	ausente	2,3
3	OD	TRI	HE / TM	ausente	2,5
3	OE	SAL	HE / TM	discreto	2,5
4	OD	TRI	HE / TM	ausente	2,4
4	OE	SAL	HE / TM	ausente	2,4
5	OD	TRI	HE / TM	ausente	2,3
5	OE	SAL	HE / TM	ausente	2,3

SAL - Solução de cloreto de sódio a 0,9%

TRI - Triacínolona acetônida (40mg/cc)

HE - Hematoxilina-eosina

TM - Tricromo de Masson

Anexo D - Descrição dos dados referentes aos animais integrantes do grupo B do estudo piloto. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 2004

Coelho	Olho	Substância	Colorações	infiltrado inflamatório	Peso (kg)
1	OD	SAL	HE / TM	moderado	2,3
1	OE	TRI	HE / TM	discreto	2,3
2	OD	SAL	HE / TM	discreto	2,4
2	OE	TRI	HE / TM	ausente	2,4
3	OD	TRI	HE / TM	discreto	2,3
3	OE	SAL	HE / TM	discreto	2,3
4	OD	TRI	HE / TM	ausente	2,2
4	OE	SAL	HE / TM	ausente	2,2
5	OD	TRI	HE / TM	discreto	2,4
5	OE	SAL	HE / TM	intenso	2,4

SAL - Solução de cloreto de sódio a 0,9%

TRI - Triacilonona acetonida (40mg/cc)

HE - Hematoxilina-eosina

TM - Tricromo de Masson

8 REFERÊNCIAS

Andreo LK, Uyemura MJ, Enzenauer R.W. 5-Fluoracil reduces scarring after strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1997; 34:107-10.

Antoszyk AN, Gottlieb JL, Machemer R, Hatchell DL. The effects of intravitreal triamcinolone acetonide on experimental pre-retinal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1993; 231(1):34-40.

Apt L, Voo I, Isenberg SJ. A randomized clinical trial of the nonsteroidal eyedrop diclofenac after strabismus surgery. *Ophthalmology*. 1998; 105: 1448-54.

Assaf AA. Seprafilm in repeated strabismus surgery to reduce surgical scarring. In Lennerstrand G (Ed.). *Advances in strabismology*. Buren - The Netherlands: Aeolus Press. 1999; p. 377-80.

Association for Research in Vision and Ophthalmology. Statement for the use of animals in ophthalmic and vision research [online]. Rockville (MD): ARVO, 2000. Disponível em <<http://www.arvo.org/animalst.htm>>. Acesso em 24 Jul. 2002.

Brito LAB, Hinsching C, Araújo EG, Damasceno AD, Vieira RC. Uso da técnica de histometria para graduação da lesão renal de nefrite intersticial em suínos abatidos em frigoríficos industriais. *Ciência Animal Brasileira*. 2005; v.6(4):261-5.

Brooks SE, Ribeiro GB, Archer SM, Elner VM, Del Monte MA. Fat adherence syndrome treated with intraoperative mitomycin-C: a rabbit model. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1996; 33(1):21-27.

Bussab WO, Morettin PA. *Estatística básica*. 5ª ed. Sao Paulo: Saraiva; 2003.

Campolattaro BN, Olistsky MS, Rogers GL. Perioperative and postoperative use of antibiotics and steroids in strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2001; 38(5):304-7.

Carrol FD, Blake EM. Repair following operations on the extraocular muscles. *Arch Ophthalmol*. 1932; 8:711-26.

Cartier MM. Viscoelásticos: fundamentos y aplicaciones clínicas. *MO Médico Oftalmólogo*. 2000; Ano 15(1). Disponível em <<http://www oftalmologos.org.ar/mo/mo151-09.html>>. Acesso em 10 Set. 2005.

Chipont E, Garcia-Hermosa P. Use of steroids after strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2000; 37(3):176-8.

Choi MY, Auh SJ, Choi DG, Chang BL. Effect of ADCON-L on adjustable strabismus surgery in rabbits. *Brit J Ophthalmol*. 2001; 85:80-4.

Ciulla TA, Criswell MH, Danis RP, Hill TE. Intravitreal triamcinolone acetonide inhibits choroidal neovascularization in a laser-treated rat model. *Arch Ophthalmol*. 2001; 119(3):399-404.

Clorfeine GS, Parker WT. Use of Healon in eye muscle surgery with adjustable sutures. *Ann Ophthalmol*. 1987; 19(6):215-7.

Cruz OA, Matkovich L. Effects of intraoperative topical mitomycin-C on strabismus surgery in the rabbit: a preliminary study. *Ophthalmic Surg*. 1995; 26(3):237-40.

Cruz OA. Evaluation of mitomycin to limit postoperative adhesions in strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1996; 33(2):89-92.

Dadeya S, Kamlesh MS, Shibal F. Prelinary results of intraoperative Daunorubicin in strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2002; 39:340-4.

Dadeya S, Kamlesh MS. Comparative evaluation of diclofenac and dexamethasone following strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2002; 39:166-8.

Danis RP, Bingaman DP, Yang Y, Ladd B. Inhibition of preretinal and optic nerve head neovascularization in pigs by intravitreal triamcinolone acetonide. *Ophthalmology*. 1996; 103:2099-104.

Derendorf H, Hochhaus G, Pohatagi S, Mollmann H, Barth J, Sourgens J, Erdmann M. Pharmacokinetics of triamcinolone acetonide after intravenous, oral, and inhaled administration. *J Clin Pharmacol*. 1995; 35:302-5.

Domínguez CA. Dispositivos y medicamentos introducidos intraocularmente para el tratamiento "en el consultorio" de enfermedades de los ojos. *An R Acad Nac Med (Madr)*. 1994; 111:377-85.

Dunlap EA. Surgery of muscle adhesions and effects of multiple operations. *Br J Ophthalmol*. 1974; 58:307-12.

Einhaus SL, Robertson JT, Dohan FC Jr, Wujek JR, Ahmad S. Reduction of peridural fibrosis after lumbar laminotomy and disectomy in dogs by a resorbable gel (ADCON-L). *Spine*. 1997; 22:1440-7.

Elsas FJ, Gowda DC, Urry DW. Synthetic polypeptide sleeve for strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1992; 29(5):284-6.

Esme A, Yildirim C, Tatlipinar S, Duzcan E, Yavlali V, Ozden S. Effects of intraoperative sponge mitomycin C and 5-fluorouracil on scar formation following strabismus surgery in rabbits. *Strabismus*. 2004; 12(3):141-8.

Estes RL, Sugar A. Knot integrity of coated synthetic absorbable sutures used for extraocular muscle surgery in a rabbit model. *J Pediatr Ophthalmol*. 1982; 19(1):25-7.

Finamor LP, Dimantas MAP, Campos VE, Prata JA Jr., Muccioli C. Efeitos da injeção subtenoniana posterior de corticóide em pacientes com uveíte. *Arq Bras Oftalmol*. 2003; 66:289-91.

Fraunfelder FT, Grove JA. *Drug induced ocular side effects*. 4th ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins. 1996; p. 289.

Goodman LS, Gilman A, Hardman JG, Limbird LE. *Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics*. 9th ed. New York: McGraw Hill. 1996. p. 1369-88.

Gordon DM. Prednisone and prednisolone in ocular disease. *Am J Ophthalmol*. 1956; 41(4):593-600.

Graham RO, Peyman GA. Intravitreal injection of dexamethasone. Treatment of experimentally induced endophthalmitis. *Arch Ophthalmol*. 1974; 92:149-54.

Havener WH. *Corticosteroid therapy. Ocular Pharmacology*. 5th ed. St. Louis, MO: CV Mosby Co. 1983; p. 433-500.

Hertle RW, James M, Farber MG. Insertion site dynamics and histology in a rabbit model after conventional or suspension rectus recession combined with ipsilateral antagonist resection. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1993; 30:184-91.

Hulley SB, Cummings SR. *Designing clinical research. An epidemiologic approach*. Filadélfia: Lippincott, Williams & Wilkins. 1988. 245p.

Hwang JM, Chang BL. Combined effect of interceed and 5-fluorouracil on delayed adjustable strabismus surgery. *Br J Ophthalmol*. 1999; 83:788-91.

Hwang JM, Chang BL. Delayed reattachment of extraocular muscles in rabbits using thin polytetrafluoroethylene. *Ophthalmic Sur Lasers*. 1997; 28:59-64.

Hwang JM, Chang BL. Use of physical barriers for delayed adjustable strabismus surgery: the effect of interceed and polyglactin 910 mesh. *Br J Ophthalmol*. 1996a; 80:759-62.

Hwang JM, Chang BL. Use of viscoat for delayed postoperative adjustable suture strabismus surgery in rabbits. *Binocul Vis Strabismus*. 1996b; 11:137-42.

Ingram RM. Tissue repair after the operations of recession and resection. *Brit J Ophthalmol*. 1965; 49:18.

Ingram RM. Wound healing after operation on the extra-ocular muscles of monkeys. *Brit J Ophthalmol*. 1966; 50:186.

Jack D. Sticky situations: surgical adhesions and adhesives. *Lancet*. 1998; 351:118.

Jonas JB, Kreissig I, Sofker A, Degenring RF. Intravitreal injection of triamcinolone for diffuse diabetic macular edema. *Arch Ophthalmol*. 2003; 121(1):57-61.

Kim JH, Jeong SY, Jung MH, Hwang JM. Use of polyurethane with sustained release dexamethasone in delayed adjustable strabismus surgery. *Br J Ophthalmol*. 2004; 88:1450-4.

Knapp P. *Treatment of divergent deviations*. In Strabismus Ophthalmic Symposium II, Allen H ed. CV Mosby, St Louis; 1958. p. 364-76.

Mahindrakar A, Tandon R, Menon V, Sharma P, Khokar S. Effectiveness of mitomycin C in reducing reformation of adhesions following surgery for restrictive strabismus. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2001; 38(3):131-5.

Meireles-Teixeira J, Moya MP, Cuperman J, Mendonça T, Nakanami C. Estudo comparativo da eficácia do uso de prednisolona e cetorolaco de trometamina tópicos após cirurgia de estrabismo. *Arq Bras Oftalmol*. 2003; 66(4):427-9.

Mills DM, Siebert LF, Climenhaga DB. Depot triamcinolone-induced glaucoma. *Can J Ophthalmol*. 1986, 21:150-2.

Minguini N, Monteiro de Carvalho KM, Akaishi PM, De Luca IM. Histologic effect of mitomycin C on strabismus surgery in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41(11):3399-401.

Mitre J. *Ação da triancinolona na fotocoagulação da retina com laser de diodo - Estudo experimental* [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina; 2004. 127p.

Mohan K, Malhi RK, Sharma A, Kumar S. Fibrin glue for conjunctival closure in strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol*. 2003; 40(3):158-60.

Moreira AT, Torres LFB, Scarpi MJ, Moreira CAM, Miranda SP, Matsumoto LH. Uso do adesivo biológico de fibrina para a reinserção de músculos retos superiores em coelhos I: Estudo clínico. *Rev Bras Oftal*. 1998a; 57(7):501-12.

Moreira AT, Torres LFB, Scarpi MJ, Moreira CAM, Miranda SP, Matsumoto LH. Uso do adesivo biológico de fibrina para a reinserção de músculos retos superiores em coelhos II: Estudo histopatológico. *Rev Bras Oftal*. 1998b; 57:585-97.

Mosby's Drug Consult. [online]. Saint Louis: Elsevier. 2005. Disponível em <<http://www.mosbysdrugconsult.com/>>. Acesso em 9 Jul. 2005.

Mueller AJ, Jian G, Banker AS, Rahhal FM, Capparelli E, Freeman WR. The effect of deep posterior subtenon injection of corticosteroids on intraocular pressure. *Am J Ophthalmol*. 1998; 125(2):158-63.

Natalie C, Kerr MD. Fat adherence syndrome: an animal model. *J AAPOS*. 2004; 8:349-56.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. Applied linear statistical models. 4^a ed. Chicago, EUA: Times Mirror Higher Education Group, Inc.. 1996.

Nguyen KD, Lee DA. Effect of steroids and nonsteroidal anti-inflammatory agents on human ocular fibroblast. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992; 33(9):2693-701.

Oh SO, Lee J. Reduction of postoperative adhesions in strabismus surgery. Korean. *J Ophthalmol*. 1992; 6(2):76-82.

Ohji M, Kinoshita SD, Ohji E, Kuwayama Y. Marked intra-ocular pressure response to instillation of corticosteroids in children. *Am J Ophthalmol*. 1991; 112:450-4.

Ohtsuki H, Hasebe S, Okuda Y, Ogou T. Is mitomycin effective in preventing muscle migration after hang-back recession in a rabbit model? *Ophthalmologica*. 1997; 211(6):373-9.

Olson JA, Steffensen EH, Smith RW, Margulis RR, Whitney EL. Use of adrenocorticotrophic hormone and cortisone in ocular disease. *AMA Arch Ophthalmol*. 1951; 45(3):274-300.

Özkan SB, Kir E, Culhaci N, Dayanir V. The effect of seprafilm on adhesions in strabismus surgery - An experimental study. *J AAPOS*. 2004; 8:46-9, 2004.

Pereira FEL. Degenerações. Morte celular. Alterações do interstício. In Brasileiro GF; Pereira FEL; Pittella JEH; Bambirra EA; Barbosa AJA. *Bogliolo. Patologia geral*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 1993; p. 45-80.

Prieto-Díaz J, Souza-Dias C. Estrabismo. 4ª ed. São Paulo: Santos. 2002; Cap.12, p.468-73: *Cirurgia do estrabismo*.

Prince JH. *The rabbit in eye research*. Springfield, Ill: Charles C. Thomas. 1964. p. 57-71.

Ruhmann AG, Berliner DL. Influence of steroids on fibroblasts. II. The fibroblast as an assay system for topical anti-inflammatory potency of corticosteroids. *J Invest Dermatol*. 1967; 49(2):123-30.

Searl SS, Metz HS, Lindahl KJ. The use of sodium hyaluronat as a biologic sleeve in strabismus surgery. *Ann Ophthalmol*. 1987; 19:259-68.

Shokida MF. Use of a silicone sheet for delayed adjustable strabismus surgery. *Ophthalmic Surg*. 1993; 24(7):486-88.

Soncini da Rosa GR, Costa FDA, Mesquita L, Costa ISEA. Estudo comparativo da eficiência do etanol e do ácido L-glutâmico na prevenção da calcificação das cúspides e parede aórtica porcina: estudo experimental em ratos. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2002; 17(2):40-51.

Tano Y, Chandler D, Machemer R. Treatment of intraocular proliferation with intravitreal injection of triamcinolone acetonide. *Am J Ophthalmol*. 1980b; 90:810-6.

Tano Y, Chandler DB, McCuen BW, Machemer R. Glucocorticosteroid inhibition of intraocular proliferation after injury. *Am J Ophthalmol*. 1981; 91:184-9.

Tano Y, Sugita G, Abrams G, Machemer R. Inhibition of intraocular proliferations with intravitreal corticosteroids. *Am J Ophthalmol*. 1980a; 89:131-6.

Teichmann KDJF. Dieffenbach: treatment of congenital squint by section of the medial rectus. *Strabismus*. 1999; 7(4):245.

Thach AB, Dugel PU, Flindall RJ, Sipperley JO, Sneed SR. A comparison of retrobulbar versus sub-Tenon's corticosteroid therapy for cystoid macular edema refractory to topical medications. *Ophthalmology*. 1997; 104:2003-8.

Tripathi A, Marsh IB. More on steroids after strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2000; 37(6):326-7.

Urban RC, Kaufman LM. Mitomycin in the treatment of hypertrophic conjunctival scars after strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1994; 31:96-8.

von Hertwig R, Rigueiro MP, Rodrigues PD, Torres FAN, Nishi M. Efeito imunossupressor da ciclosporina intra-muscular administrada em diferentes períodos pós-operatórios em um modelo de transplante penetrante de córnea em ratos. *Arq Bras Oftalmol*. 1999; 62(6):717-25.

Weiss RR, Calomeno MA, Sousa RS, Biersdorf SM, Calomeno RA, Muradás P. Avaliação histopatológica, hormonal e bacteriológica da piometria na cadela. *Arch Vet Sci*. 2004; 9:81-7.

Williams GT, Williams WJ. Granulomatous inflammation: a review. *J Clin Pathol*. 1983; 36:723-33.

Woods AC. Clinical and experimental observation on the use of ACTH and cortisone in ocular inflammatory disease. *Am J Ophthalmol.* 1950; 33(9):1325-49.

Wright M, Butt Z, McIlwaine G, Fleck B. Comparison of the efficacy of diclofenac and betamethasone following strabismus surgery. *Br J Ophthalmol.* 1997; 81:299-301.

Zajdenweber ME, Moraes RT, Muccioli C. Análise dos efeitos da injeção subtenoniana posterior de triancinolona: série de casos. *Arq Bras Oftalmol.* 2006; 69(4):509-11.

FONTES CONSULTADAS

Agresti A. *Categorical data analysis*. New York: John Wiley & Sons, 1980.

Dória Filho U. *Introdução à bioestatística: para simples mortais*. São Paulo: Negócio Editora, 1999. 152p.

Ferreira ABH. *Novo dicionário Aurélio da língua portuguesa*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1986.

Hanks P. *The new oxford dictionary of english*. Oxford: Oxford University Press, 1998.

Hornby AS. *Oxford advanced learner's dictionary of current english*. 4º ed. Oxford: Oxford University Press, 1982.

Houaiss A; Vilar MS. *Dicionário Houaiss da língua portuguesa*. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001.

Silvino WR. *Roteiro para aulas de bioestatística*. In: *Curso de Especialização em Oftalmologia*. São Paulo, 2000. Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. 2000. 26p. [Apostila]

Souza-Dias CR. *A redação do trabalho científico*. Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, 44p, 2001 [Apostila].