

Unif.
Apri 1995

VALDENIZE TIZIANI

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS GÂNGLIOS
LINFÁTICOS EM ANIMAIS TRATADOS COM INJEÇÃO
SUBCUTÂNEA DE SILICONA GEL - ESTUDO
EMPREGANDO MICROSCOPIA ÓPTICA E
MORFOMETRIA AUXILIADA POR COMPUTADOR**

**Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação do
Departamento de Anatomia Patológica da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas - UNICAMP como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor
em Ciências - Área de Anatomia Patológica**

Campinas

1995



FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Tiziani, Valdenize

T545a Aspectos morfologicos dos ganglios linfaticos em animais tratados com injecao subcutanea de silicona gel-estudo empregando microscopia optica e morfometria auxiliada por computador / Valdenize Tiziani. - - Campinas SP : [s.n.], 1995.

Orientador : Maria Leticia Cintra e Cassio Menezes Raposo do Amaral.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciencias Medicas.

1. Ganglios linfaticos.
2. Microscopia optica - Processamento de dados.
3. Rato como animal de laboratorio.
4. Silicone
5. Processamento de imagens. I. Cintra, Maria Leticia. II. Amaral Cassio Menezes Raposo do. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciencias Medicas. IV. Titulo.

ORIENTADORA

Profa. Dra. Maria Leticia Cintra

CO - ORIENTADOR

Prof. Dr. Cassio Menezes Raposo do Amaral

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

Orlando e Dirce

por terem me legado os seus valores mais legítimos,
por terem me dado amor, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À **Sub - Comissão de Pós Graduação do Departamento de Anatomia Patológica** por ter me possibilitado a oportunidade de cursar a pós graduação neste prestigioso Departamento.

Aos colegas biólogos **William Adalberto Silva e Ana Cristina de Moraes**, do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP pelo companheirismo desde o início da minha carreira como pesquisadora.

À **Professora Doutora Inês Valéria Yoshida** do Instituto de Química da UNICAMP pelas incansáveis discussões e pelos valiosos ensinamentos a respeito da química dos polímeros de silicóna.

Ao **Biólogo Luiz Augusto Correia Passos** do Centro de Bioterismo da UNICAMP pelos ensinamentos quanto às instalações e condições ambientais de manutenção dos animais no Centro de Pesquisas Experimentais da SOBRAPAR.

Ao **Centro de Bioterismo da UNICAMP** pelo fornecimento dos animais.

À **bióloga Roberta Mazzariol Volpe** pelo auxílio prestado durante os procedimentos de injeção e de coleta de material para análise realizados com os animais.

Ao **Professor Doutor Fortunato Badan Palhares**, por sua honrosa amizade e pelos ensinamentos e pelo incentivo constantes.

Ao **Departamento de Medicina Legal** pelo empréstimo do fotomicroscópio.

Às **Secretárias do Departamento de Anatomia Patológica, Maria Aparecida Francisco e Maria do Carmo Machado da Silva** pelo carinho, atenção e eficiência que marcaram sua atuação durante a minha passagem pelo referido Departamento.

Aos técnicos **Ismael Vêncio e Guaracy da Silva Ribeiro**, do Departamento de Anatomia Patológica e que atuam no Laboratório Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da

UNICAMP, pela atenção, boa vontade e esmero no trabalho de preparação das lâminas.

A todos os **funcionários, técnicos, professores, residentes e colegas da pós graduação do Departamento de Anatomia Patológica** pelo carinho com que fui recebida e por tudo que aprendi deste relacionamento com todos.

Ao colega **Biólogo Rovilson Gilioli**, pela orientação quanto ao controle sanitário dos animais.

Ao **Professor Doutor Bernardo Beiguelman**, pelo privilégio da sua amizade, pelo apoio e orientação constantes e, pelos seus ensinamentos quanto à aplicação dos métodos estatísticos.

Ao **Professor Doutor Renato Marcos Endrizzi Sabbatini**, por tudo que aprendi de informática biomédica e, principalmente, pela sua amizade, entusiasmo, confiança e incentivo constante.

À **SILIMED**, pela cessão dos implantes de silicona gel e pela receptividade encontrada junto aos seus diretores e técnicos na obtenção de informações quanto ao material estudado.

À **Bibliotecária Marisabel Regina Rodrigues do Amaral** e toda a sua equipe da **Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP** pelo auxílio e facilidades no levantamento da literatura.

Às **bibliotecárias do Serviço de Referência da Biblioteca Central da UNICAMP** que prestaram um grande auxílio no levantamento de artigos deste estudo.

Ao **Professor Doutor Ricardo Zollner** pela troca de idéias e sugestões.

À **patologista Dra. Rilde Plutarco Rodrigues Lima** pela colaboração na análise do material por microscopia óptica.

À **SOBRAPAR - Sociedade Brasileira de Pesquisa e Assistência para Reabilitação Crânio Facial** por ter oferecido o laboratório para manutenção

dos animais bem como, computadores, aplicativos e recursos de fotografia entre outros para a efetivação deste projeto de pesquisa.

À **Profa. Dra. Vera Lúcia Adami Raposo do Amaral** por poder desfrutar da sua amizade, do seu carinho e do seu incentivo constante.

Aos **Diretores e Conselheiros da SOBRAPAR** pela confiança e pelo apoio oferecido.

À **equipe técnica e funcionários da SOBRAPAR**, em especial à **Sílvia Bottcher**, ao **José Francisco Gouveia**, à **Leda Maria Adib Turchiari**, à **Marli de Souza**, e à **Simone Rondon** que de uma forma ou de outra participaram intensamente durante estes anos da minha pós graduação, oferecendo apoio e muita compreensão.

Ao **Professor Nelson Bolzani** pela sua honrosa amizade e por todo apoio e incentivo durante todos estes anos de convívio e em especial por emprestar suas habilidades e sua engenhosidade para facilitar o desenvolvimento desta pesquisa.

À **Professora Doutora Liliana de Andrade** pelo apoio e incentivo.

À bibliotecária **Vera Neumann** pela verificação final dos originais da tese quanto à citação e referências bibliográficas.

Ao **Professor Doutor Konradin Metze** por todo e apoio e pela atenção demonstrada durante a minha passagem pelo Departamento de Anatomia Patológica.

À **Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP** pela concessão de bolsa de estudos.

A todos aqueles que mesmo não tendo sido citados, contribuíram de alguma forma para que este trabalho se efetivasse.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

À Professora Doutora Maria Leticia Cintra por ter me recebido como sua orientanda, por seus conselhos e por tudo que aprendi durante esse período de proveitoso convívio. O seu modelo de profissional e de pessoa humana aliando competência e generosidade estará sempre presente em minha memória.

DESTACADA GRATIDÃO

Ao Professor Doutor Cassio Menezes Raposo do Amaral, meu grande mestre. Devo a ele a orientação da minha carreira científica e profissional, que tem como uma etapa a conclusão desta tese. O seu caráter e a sua determinação somados a um destacado espírito de generosidade e lealdade marcaram o meu caminho e o terei sempre como referencial. Agradeço a honra e o privilégio de tê-lo como amigo e conselheiro.

SUMÁRIO

Introdução	01
Objetivos	09
Revisão da Literatura	11
Material e Método	18
1. Animais de Experimentação	19
2. Silicona	21
3. Seringa empregada na injeção de gel de silicona	23
4. Condições de manutenção dos animais	24
5. Identificação e separação aleatória dos animais	26
6. Controle sanitário dos animais	27
7. Protocolo experimental	28
7.1. Injeção de silicona	28
7.2. Injeção de água destilada	29
7.3. Procedimento de necrópsia	29
8. Técnicas de Fixação e Preparação histológica empregadas	31
9. Análise qualitativa por microscopia óptica	33
10. Estudo Morfométrico	34
10.1 Técnica de medida automática de área dos gânglios linfáticos	34
10.2 Aquisição e tratamento das imagens	35
10.3 Algoritmo de medida de área	38
11. Análise estatística	42

Resultados	44
1. Macroscopia	45
2. Análise morfológica	45
3. Análise morfométrica	49
Discussão	52
1. Desenvolvimento de uma seringa especial	53
2. Discussão dos resultados	56
Conclusões	64
Resumo	66
Abstract	68
Referências Bibliográficas	70
Normas adotadas	77
Apêndice	

INTRODUÇÃO

Os compostos de silicona sofreram marcante aprimoramento durante a II Guerra Mundial, quando passaram a ser desenvolvidos com finalidade industrial. Durante a guerra, as siliconas eram empregadas na lubrificação de motores elétricos e navais, como produtos antibolhas nos motores a óleo e na diminuição do atrito de instrumentos sensíveis da Força Aérea. Com o fim do conflito, em 1945, os compostos de silicona passaram a ser empregados nas mais variadas áreas da vida moderna. Segundo BRALEY (1973) a primeira aplicação em medicina, ocorreu no revestimento de ampolas de penicilina, permitindo o melhor aproveitamento das doses do medicamento . O revestimento de frascos e ampolas contendo soluções medicamentosas perdura até a atualidade. Cateteres, sondas, seringas e agulhas, passaram a ser também lubrificados com silicona.

A silicona é um dos materiais de escolha na confecção de implantes e artefatos biomédicos sendo empregada por um grande número de especialidades médicas, o que mostra a importância de se investigar as reações do organismo a este material. Dentre as especialidades que a utilizam pode ser citada a neurocirurgia, onde as válvulas ventrículo-peritoniais de drenagem líquórica são produzidas com elastômero de silicona, assim como as lâminas empregadas em cranioplastias e, experimentalmente, os balões de embolização dos aneurismas inacessíveis cirurgicamente (MIYACHI et al., 1992). Na cirurgia urológica, as siliconas são empregadas na confecção de implantes penianos ou escrotal, ou ainda como esfíncter geniturinário (BARRETT et al., 1991). Também na oftalmologia, a silicona é empregada em implantes, próteses e lentes. Na ortopedia, lâminas de silicona são usadas nas artroplastias enquanto que na cirurgia cardíaca, válvulas cardíacas e marca-passos são feitos de silicona.

Ainda, no campo da nefrologia, os tubos das máquinas de hemodiálise são feitos de silicona (LEONG, DISNEY, GOVE, 1982; KOSSOVSKY, COLE, ZACKSON 1990).

A indústria farmacêutica emprega silicona na composição de muitos medicamentos ministrados por via oral, especialmente antiácidos e antiflatulentos.

As siliconas disponíveis para uso médico podem ser apresentadas em três estados: líquido, gel ou elastômero. A grande diferença reside no grau de polimerização e na reticulação de suas cadeias, ou seja, a silicona líquida tem uma estrutura linear, enquanto que, para se obter a forma gel e sólida, são introduzidos grupos tri ou tetra funcionais que produzem graus variáveis de reticulação das cadeias através de reações catalisadas de policondensação

É certo que propriedades como coesão (PICHA & GOLDSTEIN, 1991), micro-textura da superfície (SCHMIDT & RECUM, 1991; HAKÉLIUS & OHLSEN, 1992) e forma do material (MATLAGA, YASENCHAK, SALTHOUSE 1976), podem provocar respostas distintas do organismo. Portanto, cada uma das três apresentações das siliconas devem ser estudadas em separado.

Na década de 60 a silicona líquida comercial começou a ser empregada clinicamente, injetada como implante. Em 1965 um grupo de pesquisadores foi autorizado a estudar prospectivamente a silicona líquida como implante. Para o ensaio a indústria preparou uma substância purificada e esterilizada (Dow Corning MDX - 4-4011). Os resultados das pesquisas experimentais mostraram

que a resposta inflamatória local era leve, com a formação de múltiplos cistos diminutos delimitados por delgada cápsula fibrosa, raras células gigantes e fagocitose por células inflamatórias. Observou-se também atrofia e presença de vacúolos no tecido adiposo adjacente. Quanto aos efeitos sistêmicos, observou-se vacúolos contendo material interpretado como sílica nos gânglios linfáticos regionais, fígado, baço, rins, adrenais, e em leucócitos e hemáceas circulantes.(REES, BALLANTYNE, HAWTHORNE, 1970). Outros resultados experimentais (ANDREWS, 1966) e a experiência clínica (RAE et al, 1989; ELLENBOGEN, ELLENBOGEN, RUBIN, 1975;), fez com que a sílica no estado líquido fosse desaconselhada como implante.

Por outro lado, a sílica líquida entra em contacto com o organismo em diminutas quantidades através de injeções e cateterizações, uma vez que é usada para revestir tubos e seringas. Estima-se que uma pessoa diabética insulino dependente possa receber até 25 gramas de sílica na forma acima descrita, durante a sua vida. No entanto a literatura especializada indexada e disponível não descreve relatos de caso mencionando complicações provocadas por estas pequenas quantidades de sílica.

A sílica elastomérica tem sido utilizada em substituição a tecidos conectivos cartilaginosos e ósseos e nas válvulas, marca-passos, expansores de tecido e tubos de máquinas de circulação extra-corpórea e hemodiálise.

Nas cirurgias reconstrutoras são empregados, em geral, implantes constituídos de uma membrana elastomérica preenchida com gel de sílica. Esse tipo de implante foi proposto por CRONIN & GEROW em 1963, e desde então, tem sido utilizado nas reconstruções mamárias de pacientes mastectomizadas por

câncer, na síndrome de Poland, nas deformidades de tórax e nas mamoplastias de aumento. Estima-se que, somente nos E.U.A, aproximadamente dois milhões de mulheres tenham se beneficiado deste recurso, (FDA, 1991). Além das cirurgias de mama, implantes com a mesma característica descrita têm sido empregados na substituição protética de testículos e na cirurgia reparadora das regiões glútea e poplítea.

Nesses quase trinta anos de utilização dos implantes mamários de silicona gel, uma das intercorrências mais freqüentemente descritas tem sido a contratura da cápsula tissular (DESTOUET et al., 1992)

Sabe-se que a cápsula fibrosa dos implantes mamários de silicona gel pode contrair-se, aumentando a consistência do implante à palpação das mamas, podendo levar à necessidade de retirada do mesmo, pela dor e desconforto.

A histologia da cápsula tissular com o intuito de identificar os mecanismos de sua contratura mostrou a existência de vacúolos contendo material estranho, não corável, entremeando as fibras colágenas ou dentro de células inflamatórias (SMAHEL, 1977; BARKER & SCHULTZ, 1978; BARKER, RETSKY, SCHULTZ., 1978; RUDOLPH et al., 1978; HAUSNER, SCHOEN, PIERSON, 1978; AMARAL et al., 1992).

Estudos "in vitro" demonstraram que os implantes de silicona gel perdem substâncias para o ambiente (BERGMAN & ENDE, 1979;). Outros estudos mostraram que as próteses podem ser infiltradas por material orgânico, confirmando a característica semi permeável da membrana de elastômero de sílica, que faz a contenção do implante (AMARAL et al., 1990).

A análise destas observações conduziu à suposição de que o material estranho observado na cápsula fibrosa poderia estar relacionado a gotículas de silicona desprendidas do gel, através da parede semipermeável do implante.

Com o objetivo de diminuir esta permeabilidade, a indústria desenvolveu membranas com características especiais (BARKER, RETSKY, SEARLES, 1985). No Brasil, a membrana dos implantes fabricados na atualidade é constituída por uma camada tripla.

Além da silicona que "escapa" do implante, é interessante notar, ainda, que a membrana elastomérica do implante pode sofrer rotura, dada a corrosão experimentada com o tempo, deixando extravasar o gel para o organismo. De acordo com alguns estudos, 5% das pessoas com implantes mamários de gel de silicona apresentam o rompimento espontâneo e imperceptível da membrana do implante (DESTOUET et al., 1992). Observou-se ainda que à medida que aumenta o tempo de permanência do implante no organismo, aumenta o número de implantes rotos ou vazando (CAMARA et al., 1993).

Em 1992, a "Food and Drug Administration", órgão regulamentador e fiscalizador na área de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos da América, proibiu nesse país a comercialização e a introdução dos implantes de silicona gel na região mamária. Uma das razões expostas pela F.D.A. para tal proibição foi o desconhecimento dos efeitos que a silicona gel, que escapa dos implantes, poderia estar provocando no organismo.

Alguns autores estudaram a resposta inflamatória local à silicona gel (VISTNES, BENTLEY, FOGARTY, 1977; BARKER & SCHULTZ, 1978; PICHA & GOLDSTEIN., 1991; PALOMERO et al., 1991; AMARAL et al., 1993) tendo sido demonstrada a formação de cápsula fibrosa quando implantada no espaço subcutâneo de animais de experimentação.

Alguns relatos clínicos descrevem a presença de silicona e células gigantes nos gânglios linfáticos axilares de pacientes que receberam implantes mamários de silicona gel (HAUSNER, SCHOEN, PIERSON, 1978; HAUSNER et al., 1981), que sofreram rotura do implante mamário de silicona gel (GOIN, 1978), e que receberam implantes mamários de silicona gel recobertos por poliuretano (WINTSCH, SMAHEL, CLODIUS, 1978).

Por outro lado, algumas evidências sugerem que não ocorrem alterações nos gânglios linfáticos na presença de implantes de silicona gel. Um trabalho experimental foi realizado com o objetivo de estudar a cápsula fibrosa, tendo sido examinados também, os gânglios linfáticos de treze animais injetados com silicona, não se observando alterações (BARKER & SCHULTZ, 1978). (HAUSNER et al., 1981).examinaram os gânglios linfáticos de uma paciente submetida a mastectomia e que havia permanecido por dois anos com implantes mamários de silicona gel, não tendo sido detectada a presença de material estranho.

Em pesquisa anterior, AMARAL et al., 1993 não encontraram alterações anátomo-patológicas empregando microscopia óptica comum, nos órgãos viscerais de animais injetados com silicona gel, quando comparados a um grupo controle ao qual foi administrada solução fisiológica subcutânea.

No entanto, até onde se pôde investigar na revisão da literatura, não há estudos examinando os gânglios linfáticos de animais submetidos a injeção de silicona gel livre comparativos a um grupo controle.

O presente estudo foi delineado com o objetivo de investigar possíveis alterações morfológicas em gânglios linfáticos de ratos submetidos à injeção subcutânea de silicona gel, que pudessem sugerir a difusão do material no organismo e/ou processo reacional dos gânglios linfáticos à sua presença.

OBJETIVOS

1. Detectar alterações morfológicas, por microscopia óptica comum, sugestivas de processo reacional à silicona gel, em gânglios linfáticos axilares e inguinais de ratos Wistar tratados com injeção subcutânea de silicona gel..
2. Detectar alterações morfológicas ao nível da microscopia óptica comum consistentes com a migração de silicona gel para os gânglios linfáticos axilares e inguinais de ratos Wistar, submetidos à injeção subcutânea de silicona gel.
3. Detectar, por métodos morfométricos, a ocorrência de hiperplasia de gânglios linfáticos axilares e inguinais de ratos Wistar submetidos a injeção subcutânea de silicona gel.

REVISÃO DA LITERATURA

BOO-CHAI (1969), relatou sua experiência utilizando gel de silicona em mamoplastias de aumento, introduzindo a substância através de descolamento inframamário. Uma das principais complicações relatadas foi a migração centrífuga do gel formando coleções separadas, muitas vezes infiltrando o parênquima mamário ou se acumulando no tecido intradérmico. O autor observou um aumento da sensibilidade e dor algumas semanas depois. Uma cápsula fibrosa se formou em torno da silicona.

FERREIRA, SPINA, IRIYA (1975) realizaram um estudo experimental com a finalidade de verificar alterações no organismo de ratos com implantes de silicona gel colocados no espaço intraperitoneal e subcutâneo. Os autores empregaram silicona fabricada pela Koken Kogyo com viscosidade de 300,000 centistokes. A parede peritoneal, os tecidos do local da injeção subcutânea, o coração, pulmões, fígado, baço, rins e adrenais foram examinados. Nas amostras do peritônio e do local da injeção subcutânea foram observados vacúolos envoltos por histiócitos, células gigantes e linfócitos e, ainda, vacúolos intracelulares. Aos 30 dias, observaram-se alterações nos pulmões de dois animais que receberam respectivamente 1 e 5 ml via intraperitoneal e, também, alterações pulmonares aos 60 dias, nos animais que receberam injeção subcutânea de 5 ml. Estas alterações se caracterizavam pelo espessamento do septo alveolar, às custas de acúmulo de linfócitos, plasmócitos, células gigantes e histiócitos com microvacúolos incolores aos corantes usuais.

BARKER & SCHULTZ (1978) realizaram um estudo experimental com o fim de identificar silicona na cápsula tissular, utilizando gel de silicona livre, implante de solução salina, implante testicular contendo gel, implante testicular sólido e discos de silicona sólida.. Observaram a presença de vacúolos de

silicona nas cápsulas fibrosas. Examinaram também os gânglios linfáticos de treze animais, e em nenhum foi encontrada silicona.

HAUSNER, SCHOEN, PIERSON (1978) analisaram a cápsula fibrosa formada ao redor de um implante mamário de gel de silicona que necessitava ser retirado em virtude do desenvolvimento de tumoração da mama, que culminou com mastectomia total. Na análise microscópica da amostra observou-se o acúmulo focal de grandes histiócitos com vacúolos citoplasmáticos. Estes vacúolos, continham um material refrátil microscópicamente idêntico ao gel aderido ao lado interno do envelope. Nem o gel de silicona nem o material presente dentro dos histiócitos mostrou-se birefringente, quando examinados por polarizadores cruzados. O exame histológico dos gânglios linfáticos axilares, mostrou a presença de inúmeras células gigantes multinucleadas com citoplasma eosinófilo e vacúolos proeminentes, muitos dos quais preenchidos por material refrátil, não birefringente, ópticamente idêntico ao gel e ao material observado nos histiócitos, junto ao local do implante. Em nenhum dos casos observou-se o material estranho fora das células.

WINTSCH , SMAHEL, CLODIUS (1978) examinaram um linfonodo de uma paciente com implantes mamários de gel de silicona recobertos de poliuretano, pesquisando a presença de silicona. Utilizaram a combinação de espectrofotometria infra-vermelho e micro-sonda eletrônica, revelando a presença, no gânglio linfático de espectros semelhantes aos das metil-siliconas e compostos de silício.

GOIN (1978) estudou uma paciente submetida a capsulotomia em campo fechado com rotura do implante mamário e desenvolvimento de uma coleção de sílica na axila direita. O exame microscópico do gânglio linfático axilar direito mostrou uma reação granulomatosa de corpo estranho com vacúolos de tamanhos variados, compatível com uma reação granulomatosa à sílica gel. Um extrato do gânglio linfático macerado em xileno foi examinado por espectrometria infra vermelho, sugerindo a presença da sílica.

HAUSNER et al. (1981) observaram a presença de material refrátil e não birefringente no citoplasma de células gigantes de corpo estranho na porção residual do tecido do gânglio linfático livre de tumor, de uma paciente com recidiva de adenocarcinoma da mama. Oito anos antes, a paciente havia se submetido a mastectomia bilateral e reconstrução mamária com implantes de sílica gel. Posteriormente a paciente desenvolveu a doença de Paget e adenocarcinoma infiltrativo, tendo sido encaminhada para mastectomia modificada radical, incluindo a remoção dos implantes e dos gânglios linfáticos axilares, que já apresentavam tumores metastáticos. Os autores descreveram, também, os achados dos gânglios linfáticos de uma outra paciente que permaneceu com os implantes mamários por dois anos, antes de se submeter a mastectomia e dissecação dos gânglios linfáticos, não tendo sido encontrado material estranho.

TRUONG et al (1988) utilizaram análise elementar por energia dispersiva de raios X e microscopia eletrônica de varredura, para comprovar a presença de silício em gânglios linfáticos de pacientes que haviam recebido injeção de sílica líquida ou implantes mamários de gel de sílica. À histologia observou-se um processo focal, com vacúolos e células gigantes

multinucleadas, todos contendo material refrátil não birrefringente e não corável por todos os métodos rotineiros de coloração. Todas as cápsulas fibrosas, com exceção das duas de uma paciente, apresentaram material refrátil na parede. A cápsula formada ao redor de um implante roto apresentou as alterações mais significativas. Na maioria dos gânglios linfáticos, a silicona produziu alteração multifocal microscópica e, ocupou uma porção muito pequena do córtex e da medula. Mas, em dois gânglios linfáticos, as alterações ocuparam mais de 60% da superfície dos cortes. Estas alterações incluíram vacúolos grosseiros, vacúolos finos, células gigantes multinucleadas e material refrátil. Os vacúolos grosseiros geralmente mostraram-se circulares e de tamanho variado, medindo 130 micrômetros de diâmetro. Na opinião dos autores, eles estavam, provavelmente, preenchidos por silicona, que foi totalmente perdida durante o processamento do tecido, deixando apenas espaços vazios. Em alguns vacúolos, a silicona permaneceu parcialmente, como um material refrátil, não birefringente e não corável. Os vacúolos finos foram observados no interior dos histiócitos, criando um aspecto espumoso no citoplasma, ou no espaço extracelular. A refração destes vacúolos era muito pequena ou inexistente. Observaram numerosas células gigantes multinucleadas contendo vacúolos citoplasmáticos de diferentes tamanhos, preenchidos por material refrátil. A análise dispersiva de raios X aplicada nos gânglios linfáticos de oito casos mostrou um pico do elemento silício em sete deles. Examinaram-se, como controle, gânglios linfáticos de pacientes com diagnóstico de carcinoma mamário que não usaram implante de silicona gel ou injeção de silicona líquida. Observou-se, em 34% das amostras, a presença de vacúolos grosseiros preenchidos, provavelmente por gordura. Uma célula gigante multinucleada foi vista em um caso (0.3%).

TABATOWSKI, CRAIG, JOHNSTON (1990) descreveram os achados em uma paciente que havia se submetido a mamoplastia de aumento com colocação de implante há 14 anos, e que desenvolveu um nódulo axilar na mama direita. Exames clínicos e radiológicos não evidenciaram rotura dos implantes nem tampouco sinais de malignidade nas mamas. Uma biopsia aspirativa seguida de um estudo citológico revelou padrões de reação granulomatosa do tipo corpo estranho. Duas semanas após o gânglio linfático foi excisado, e a histopatologia confirmou o resultado. Microscopia eletrônica de varredura identificou o material estranho observado dentro das células gigantes como sendo sílica.

PALOMERO et al. (1991), num estudo experimental com ratos, colocaram implantes de sílica gel intraperitonealmente e uma fração de um elastômero de sílica nos espaços intraperitoneal, intramuscular e subcutâneo. A reação tissular foi examinada aos 15, 30, 47 e 85 dias após a implantação. Quando colocados intraperitonealmente, os implantes de sílica não provocaram a formação de cápsula fibrosa, com exceção de um caso que, aos 15 dias, apresentou a sílica gel encapsulada, retroposicionada e aderida ao fígado. Analisaram por microscopia óptica também os pulmões, o fígado, o baço, os rins, a próstata, os testículos, o intestino e os ovários. Em nenhum dos órgãos se observou a presença da sílica. Na interpretação dos autores, o fato de não se formar cápsula fibrosa no peritônio sugere que a cápsula é um processo cicatricial e não uma reação orgânica à sílica como um corpo estranho.

A reação inflamatória local ao gel de silicona no tecido celular subcutâneo foi estudada por AMARAL et al. (1993) em ratos Wistar adultos. Notou-se predominância de células inflamatórias mononucleares com linfócitos e histiócitos mais freqüentemente vistos que plasmócitos. Formou-se uma cápsula fibrosa envolvendo a silicona injetada, assumindo uma forma discóide, mais espessada nas extremidades, seguida por uma reação inflamatória. Pequenas quantidades de material estranho, interpretado como silicona, foram observadas entre os fibroblastos na cápsula fibrosa. Foi pesquisada também a migração da silicona para outros órgãos viscerais, sendo que nenhuma evidência foi encontrada da presença do material nos órgãos analisados.

LIN, DILEONARDO, JACOBY (1993) relatam os achados de uma paciente submetida a mamoplastia de aumento com inserção de implante mamário de silicona gel. Dois anos e meio após a cirurgia foi observado aumento dos gânglios linfáticos axilares acompanhado de sensação dolorosa. A biopsia dos gânglios linfáticos mostrou numerosos vacúolos de tamanhos variados no citoplasma de histiócitos.

MATERIAL E MÉTODO

1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

No presente experimento foram empregados 195 ratos (Rattus norvegicus albinus, Rodentia Mammalia), linhagem Wistar, heterogênicos, SPF ("Specific Pathogen Free"), machos, gentilmente cedidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP . Desses animais, 96 foram selecionados aleatoriamente para o grupo que recebeu injeção de sílica, 96 no grupo controle, e os outros três animais constituíram o grupo de controle sanitário da colônia.

A idade dos animais variou de 79 a 248 dias no momento da injeção, com média de 157,83 dias (Desvio Padrão = 43,76; N = 181). Os animais apresentavam em média peso de 379,83 gramas (Desvio Padrão = 57,47; N = 181) variando entre 280 e 520 gramas no momento da injeção (Tabela 1) . As amostras de onze animais foram eliminadas do estudo devido a problemas técnicos.

Tabela 1 - Idade em dias e peso médio em gramas dos animais no início do experimento, imediatamente antes de serem submetidos aos procedimentos de injeção

Período de Observação	Número de Animais	Idade na Injeção	Peso na Injeção Média / D.P.
1	16	160	390,63 / 49,73
3	16	159	370,63 / 53,48
7	16	105	360,63 / 40,57
10	16	155	365,94 / 37,91
15	16	157	358,75 / 45,73
30	16	120	365,63 / 33,06
60	15	120	345,33 / 38,33
90	16	248	440,63 / 41,71
120	13	212	401,54 / 53,67
180	16	191	421,56 / 49,99
270	14	172	382,14 / 30,93
365	11	80	346,36 / 119,73

2. SILICONA

A silicona gel empregada na pesquisa foi obtida de 10 unidades de implantes mamários do tipo super impermeável, com volume unitário de 100 ml, esterilizados a vapor pelo fabricante (SILIMED , RJ).

De acordo com as especificações fornecidas pelo fabricante, o gel apresentou as seguintes características:

- viscosidade : 1000 cPs
- massa molar : 30.000
- gravidade específica : 0,97 (água = 1)

Aos testes de solubilidade em álcool, xileno, éter e tetracloreto de Carbono, realizados no Instituto de Química da UNICAMP, o material não se mostrou solúvel. Observou-se um encharcamento do material na presença do éter e do tetracloreto de Carbono.

Também no Instituto de Química da UNICAMP fêz-se a análise do material por espectroscopia infravermelho (figura 1). Foi realizada também uma análise termogravimétrica (TGA) da silicona gel (figura 2).

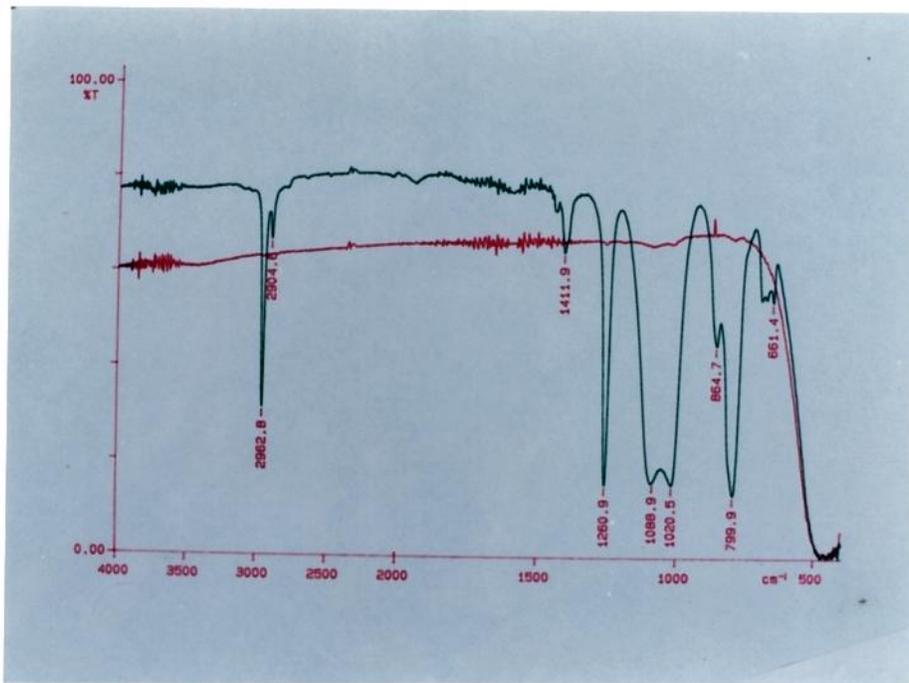


Figura 1 - Espectro infravermelho da silica gel empregada no experimento

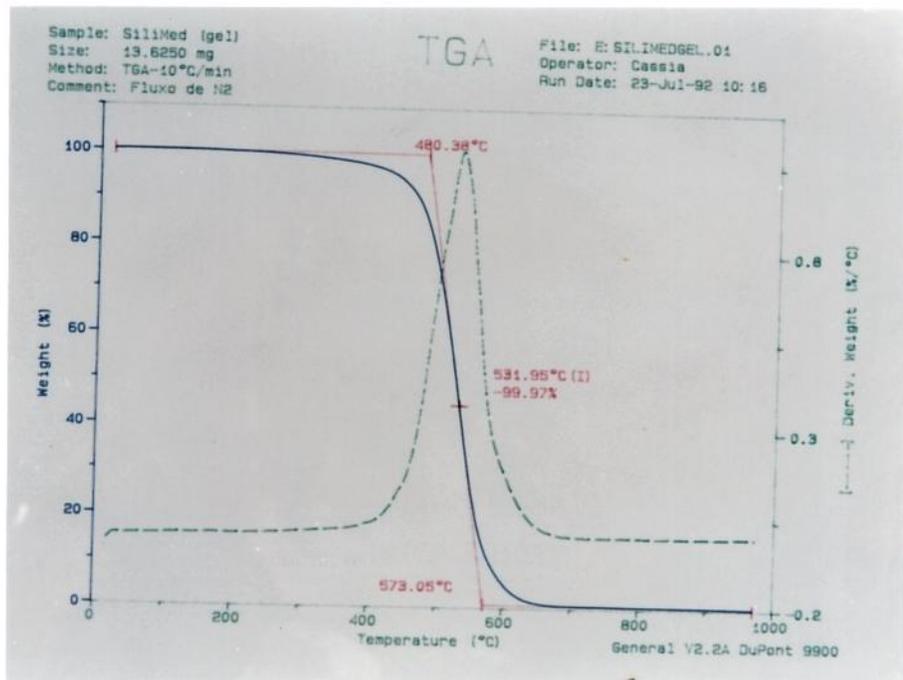


Figura 2- Análise termogravimétrica da silica gel

3. SERINGA EMPREGADA NA INJEÇÃO DO GEL DE SILICONA

A seringa utilizada no experimento, com capacidade de 50 ml (Figura 3), foi projetada e construída pelo Professor Nelson Bolzani na Área de Desenvolvimento Tecnológico do Centro de Pesquisas da SOBRAPAR. Antes de cada procedimento a seringa foi esterilizada em óxido de etileno

A colocação da silicona dentro da seringa foi possível aplicandõ-se vácuo à extremidade onde se adapta a agulha, enquanto que a extremidade onde é introduzido o êmbolo, esteve apoiada sobre a prótese rota, permitindo que o material preenchesse o corpo da seringa.

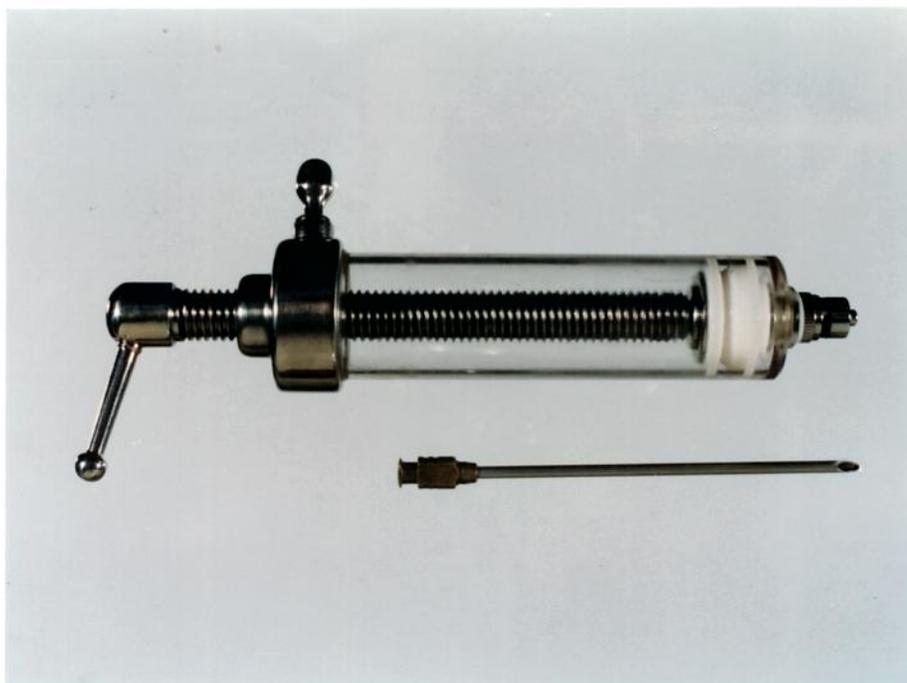


Figura 3. seringa de 50 ml desenvolvida no Centro de Pesquisas Experimentais da SOBRAPAR, com sistema de rosca para facilitar o deslizamento do êmbolo.

4. CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais, após serem identificados, foram relocados ao ambiente definitivo para a adaptação física e alimentar, sendo observadas as suas condições de saúde pelo período compreendido entre um e seis meses. Permaneceram, durante todo o experimento, em gaiolas de polipropileno, com tampa de arame galvanizado, no Biotério de Manutenção de Animais do Centro de Pesquisas Experimentais do Hospital de Cirurgia Plástica Crânio Facial da SOBRAPAR.

As condições ambientais do biotério incluíram a renovação constante do ar, através de insuflação e sucção permanentes, à taxa de 17 trocas por hora* e temperatura ambiente. Foram alternadas 12 horas de luz alternadas com 12 horas de escuro, com o uso de um temporizador.

A desinfecção das gaiolas foi feita três vezes por semana, ocasião em que a caixa plástica, os bebedouros e a cama de maravalha eram substituídos e a ração completada.

A cama de maravalha de pinus e a ração** foram esterilizadas em autoclave, a 130 graus Celsius, por 60 minutos, em todas as trocas, que se fizeram três vezes por semana.

* Testes realizados pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP

** Labina, PURINA

Em todas as trocas, as gaiolas bem como os bebedouros, após lavados, permaneceram por vinte e quatro horas imersos em solução de hipoclorito de sódio a 10% ou solução de Quaterkil (Cloreto de N - alquil dimetil benzil amônio) na diluição de 1:40.

As paredes e as estantes foram desinfetadas uma vez por semana, enquanto que o piso foi desinfetado três vezes por semana, utilizando-se solução de hipoclorito de sódio a 10%, ou solução de Quaterkil na diluição de 1:40.

A ração e a água foram servidas "ad libitum" aos animais durante todo o experimento.

5. IDENTIFICAÇÃO E SEPARAÇÃO ALEATÓRIA DOS ANIMAIS

Três animais foram aleatoriamente isolados em uma gaiola para serem necropsiados pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP, com a finalidade de se controlar a qualidade sanitária da colônia. Este grupo foi denominado controle sanitário.

Os demais animais foram aleatoriamente distribuídos em gaiolas, completando o número final de quatro animais por gaiola.

Tomando-se duas gaiolas quaisquer, numeraram-se ao acaso seus animais com orifícios nas orelhas direita e esquerda, na seqüência de 1 a 8. Desta forma, cada grupo de oito animais foi dividido em duas gaiolas. No momento de se proceder a injeção da silicona ou água destilada nos animais, os grupos foram tomados ao acaso. Formaram-se, portanto, 12 grupos de 8 animais que receberam injeção de silicona, daqui para a frente chamados simplesmente de tratados e 12 grupos de 8 animais daqui para a frente chamados simplesmente de grupo controle.

6. CONTROLE SANITÁRIO DOS ANIMAIS

Para o controle sanitário dos animais da colônia, ao sacrifício, colheu-se sangue de 65 animais para sorologia, sendo 30 amostras dos grupos tratados, 32 amostras dos grupos controle e 3 amostras do grupo de controle sanitário. Os animais dos grupos tratado e controle foram selecionados ao acaso dentre os animais da mesma gaiola, para a coleta de sangue. Realizou-se a titulação de anticorpos, pesquisando-se Imunoglobulina G por imunofluorescência indireta e inibição de hemaglutininas, para treze tipos distintos de vírus conhecidos (RCV - Rat Corona Virus, SDAV - Sialodacryoadenitis virus, TEMV-GD7 - Theiler encephalomyelitis, PVM - Pneumonia virus of mice, SENDAI - Paramyxovirus - Parainfluenza 1, MVM - Minute Virus of Mice, LCM - Lymphocytic Choriomeningitis virus, KRV - Kilhan rat virus, TOOLAN (H.1) - parvovirus, ROTA - grupo A, REO-3 - reovirus 3, M-CMV murino citomegalovirus, M-ADENO adenovirus, para uma bactéria (*Bacillus piliformis*) e para um protozoário (*Toxoplasma gondii*). As amostras de soro foram testadas à diluição de 1:20.

Para se investigar a contaminação por *Mycoplasma pulmonis*, desparafinou-se e hidratou-se cortes histológicos de pulmão de animais da colônia e empregou-se imunofluorescência indireta e imunocitoquímica com peroxidase.

Os três animais do grupo de controle sanitário da colônia foram necropsiados pelo Laboratório de Virologia e Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB - Centro de Bioterismo da UNICAMP. Após a necropsia, pesquisou-se também a presença de parasitos, empregando-se o exame da carcaça e dos pêlos da região cervical e base auricular, com o auxílio de um microscópio

estereoscópico. Os pêlos foram clarificados pelo líquido de Hoyer. A pesquisa de endoparasitos se procedeu pelo exame estereomicroscópio do conteúdo intestinal e pelos métodos de Hoffmann e Willis.

OBSERVAÇÕES QUANTO AO CONTROLE SANITÁRIO

Nas amostras de todos os animais estudados identificaram-se os parvovírus “Kilham Rat Vírus” (KRV) e “Toolan” (H1), pela técnica de inibição da hemaglutinação e, na colônia dos animais dos grupos de 90 a 365 dias, foi detectada a presença também do “Minute Virus of Mouse” (MVM), através do exame de imunofluorescência indireta.

O emprego de imunofluorescência indireta e imunocitoquímica com peroxidase, não detectou reação positiva para *Mycoplasma pulmonis*

À necropsia dos animais controle da colônia no Centro de Bioterismo - Laboratório de Controle Sanitário, não foram observadas anormalidades. O exame parasitológico mostrou a presença de um tipo de helminto, o *Syphacia muris*.

7. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

7.1 Injeção da Silicona

Sob anestesia inalatória com éter etílico (P.A.), 96 animais (12 grupos de oito animais cada, identificados e separados ao acaso) sofreram a raspagem dos pelos das regiões ventral e dorsal e foram pesados . A seguir, receberam

injeções de gel de silicona, sendo 1,5 ml no espaço subcutâneo do dorso à direita e 1,5 ml no espaço subcutâneo do abdomen à esquerda, após assepsia com álcool iodado.

7.2 Injeção de Água Destilada nos Animais dos Grupos Controle

Noventa e seis animais (12 grupos de oito ratos, isolados ao acaso, dentre os animais previamente identificados) constituíram o grupo controle e, sob anestesia com éter etílico, após terem os seus pelos raspados e serem pesados, receberam, nas mesmas regiões descritas para o grupo tratado, injeção de água destilada hipotônica.

Terminado o procedimento, os animais foram mantidos em gaiolas limpas. Receberam ração e água "ad libitum".

7.3 Procedimento das Necropsias

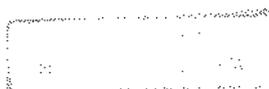
Os animais foram observados até o momento programado para o sacrifício. Oito animais tratados e oito animais controle foram sacrificados ao final dos seguintes períodos de tempo: 1, 3, 7, 9 15, 30, 60, 90, 120, 180, 270 e 365 dias.

Sob anestesia inalatória com éter etílico, os animais sofreram novamente a raspagem dos pelos e foram pesados. Foram sacrificados , seccionando-se vasos de grande calibre ou puncionando o coração para a coleta de sangue para o estudo sorológico.

Através de uma incisão longitudinal no abdome do animal, com lâmina de bisturi nº 20, descolou-se a pele no plano supra aponevrótico até a região inguinal e axilar, nos lados direito e esquerdo do animal. Com a tesoura cortou-se a pele, e a seguir fez-se um corte transversal na face ventral do músculo grande dorsal, expondo-se, desta forma, o plexo braquial. Com uma tesoura pequena, dissecou-se o bloco de tecido adiposo aderido aos vasos e nervos do plexo braquial. Na região inguinal, retirou-se o bloco de tecido adiposo do flanco, próximo à veia epigástrica, onde estão situados os gânglios linfáticos inguinofemorais.

Sobre um bloco de parafina sólida, e com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15, dissecaram-se os minúsculos gânglios linfáticos dentre o tecido adiposo envolvente.

O material foi então fixado e preparado para a análise histológica.



8. TÉCNICAS DE FIXAÇÃO E PREPARAÇÃO HISTOLÓGICA EMPREGADAS

Adicionou-se de 10 a 20 vezes o volume de solução fixadora relativamente ao volume do material a ser fixado. A fórmula do fixador utilizado é descrita a seguir.

Fixador "FMA"

Composição

Formaldeído 40%100 ml
Cloreto de mercúrio Merck P.A.....	20 g
Ácido acético glacial Merck P.A.	30 ml
Água Destilada1000 ml

Preparo

O Cloreto de Mercúrio foi dissolvido em água, sob aquecimento. Foram adicionados os outros reagentes e deixou-se descansar por algumas horas, para se permitir a ionização.

O material foi mantido no fixador durante 1,5 a 2,5 horas. A seguir foi diretamente mergulhado em álcool etílico a 70% onde permaneceu até ser processado pelo histotécnico, para desidratação, clarificação e inclusão em parafina.

Os blocos foram cortados em micrótomo, obtendo-se secções de 4 a 6 micrômetros. A seguir os cortes foram corados com hematoxilina e eosina ou azul da Prússia (método de Perls).

9. ANÁLISE QUALITATIVA POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Ao aumento de 40 vezes, contou-se o número de gânglios linfáticos de cada animal, lâmina por lâmina (quatro lâminas por animal, correspondendo às quatro regiões estudadas, axilares e inguinais).

Ao aumento de 100 vezes, observou-se a estrutura geral de cada gânglio linfático, incluindo contornos, forma, provável incidência do corte, estruturas circunvizinhas, cápsula, região cortical e sinus, região medular e sinus, região do hilo, vasos linfáticos, vasos sanguíneos e células predominantes em cada região.

Ao aumento de 400 vezes, procurou-se identificar as características celulares dos histiócitos, células reticulares, linfócitos e demais tipos celulares presentes nos gânglios linfáticos.

Investigou-se em especial, a presença de substâncias estranhas, sugestivas de sílica, bem como a presença de células gigantes típicas de reação de corpo estranho, histiócitos com características fagocíticas, centros germinativos ou qualquer outra evidência de que os gânglios linfáticos estivessem em processo reacional. A sílica foi primeiramente estudada à microscopia óptica, nos fragmentos da região injetada, para se conhecer suas características e se lograr a sua identificação caso estivesse presente nos gânglios linfáticos.

A análise por microscopia de luz foi feita por dois observadores independentes, sendo um deles a própria pesquisadora e o segundo um patologista experiente, na forma de um estudo cego unilateral.

10. ESTUDO MORFOMÉTRICO

10.1 Técnica de Medida Automática da Área dos Gânglios Linfáticos

O tamanho relativo de cada gânglio linfático, processado histologicamente neste trabalho, foi calculado automaticamente através de sistema de morfometria computadorizada, consistindo de uma câmera de vídeo, microcomputador e um programa especialmente desenvolvido para obter as medidas de área do corte histológico de cada gânglio linfático que serviram como base para a análise estatística (Fig 4).

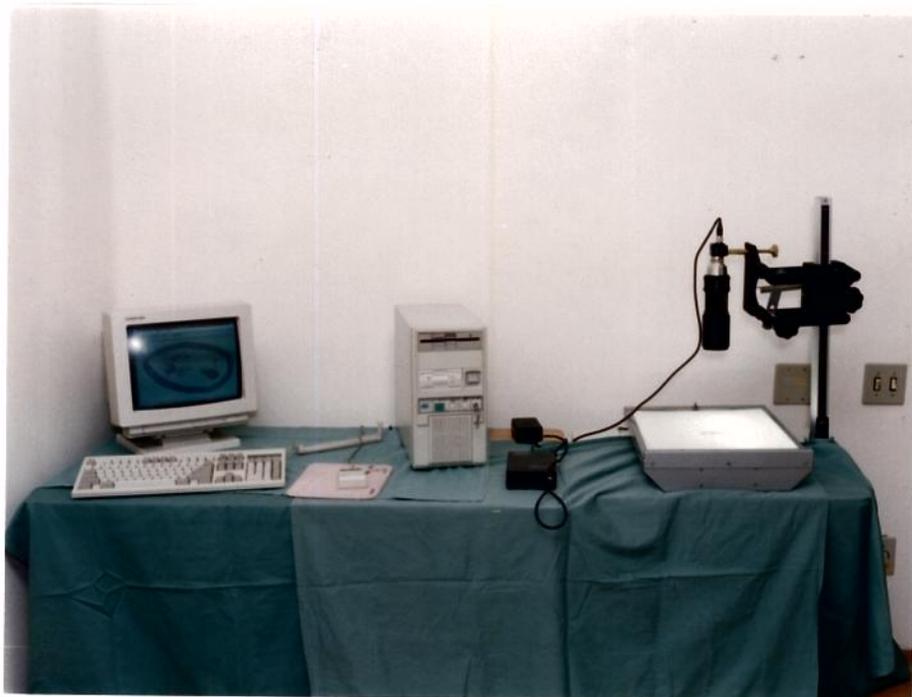


Figura 4 - Visão panorâmica do sistema de aquisição de imagens com o auxílio do computador

10.2 Aquisição e Tratamento das Imagens

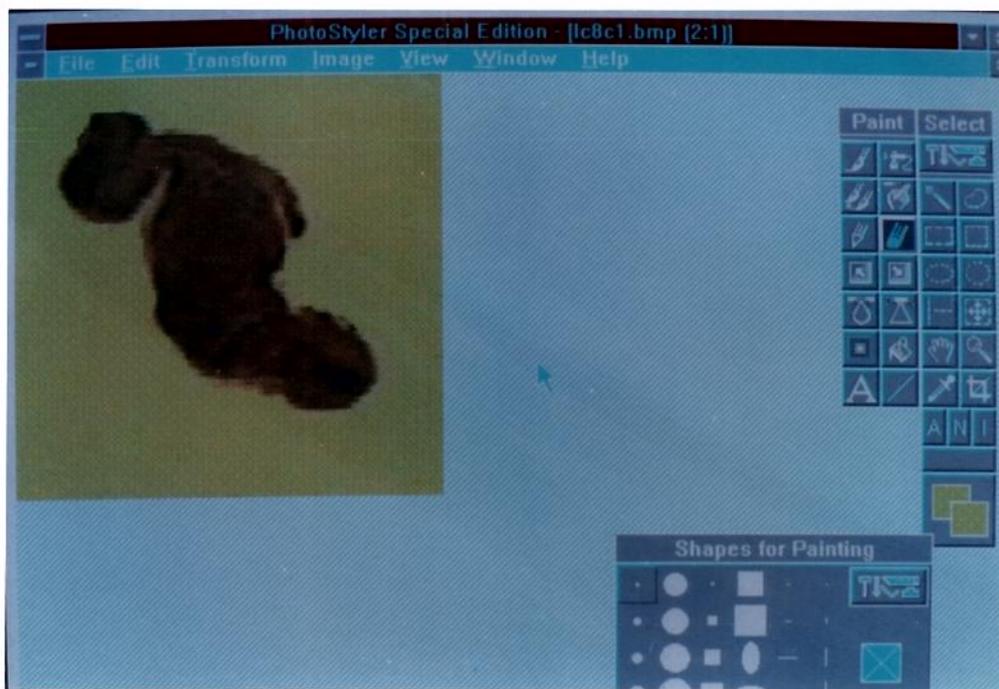
A lâmina de vidro contendo o corte histológico foi colocada sobre um negatoscópio, que por sua vez foi posicionado sob uma estativa na qual fixou-se uma câmera filmadora na posição vertical. A câmera filmadora empregada foi um modelo Toshiba CCD - "charge coupled device" , com sistema de gravação em vídeo de 8 mm VTR, com resolução de 270 linhas de TV, desenhada para ser acoplada a fibra óptica em exames nasofaringoscópicos ou a microscópios. Esta foi conectada a uma lente objetiva macro de 250 mm ROKINON , diâmetro 58 mm, 1 : 4,5 / 4,8, $f = 80 - 250$ mm, através de uma peça adaptadora desenvolvida pelo Centro de Tecnologia da UNICAMP e um alongador da lente objetiva NIKKOR - M2. A lente objetiva na posição macro esteve sempre a uma distância de 20 cm da lâmina. O campo visual foi selecionado por deslocamento manual da lâmina, até se obter o enquadramento total da região de interesse (gânglio linfático a ser avaliado). Após a focalização adequada da primeira lâmina, a distância da lente e as demais condições de luminosidade e magnificação foram mantidas constantes para todas as imagens adquiridas.

A saída da câmera filmadora foi ligada por um cabo a uma interface de aquisição de vídeo digital de 16 bits de resolução (Video Blaster Modelo, Creative, Inc., E.U.A.) inserida a um microcomputador de 32 bits, compatível com IBM -PC, com processador Intel 80486, 33 MHz, 4 Mbytes de memória RAM e placa de vídeo gráfica tipo super VGA (256 cores resolução 1024 X 768 pixels).

O processo de aquisição das imagens foi obtido com o programa Video KIT-SE da seguinte maneira: a região de interesse foi localizada visualmente e delimitada com um retângulo deslocado pelo cursor na tela. Essa subregião foi então gravada em disco, usando-se o formato BMP (*Bit MapPed display*) para MS-Windows 3.1 (Microsoft, Inc., E.U.A.); com 24 bits de resolução por pixel. O arquivo, assim gravado, foi utilizado a seguir pelo programa PhotoStyler for Windows (Aldus, EUA), com a finalidade de se examinar visualmente e apagar manualmente da imagem as áreas não desejadas, tais como resíduos de coloração e tecido fibroadiposo presentes ao redor das imagens dos cortes dos gânglios linfáticos (Fig 5a, 5b) .O objetivo deste procedimento foi de aumentar a precisão da medida de área pelo algoritmo morfométrico. Em seguida, a imagem BMP foi gravada novamente em disco, e captada diretamente pelo programa de morfometria. Foram gravados desta maneira 753 arquivos de imagem.



a)



b)

Figura 5 - a) Imagem do corte do gânglio linfático com tecido fibroadiposo envolvente b) Imagem do mesmo corte após seleção feita com o auxílio do programa Aldus PhotoStyler

10.3 Algoritmo de Medida de Área

A área do gânglio linfático, na imagem BMP do corte histológico, foi medida por um programa especialmente desenvolvido em Turbo BASIC pelo Prof. Dr. Renato M.E. Sabbatini (Núcleo de Informática Biomédica da UNICAMP), denominado BMPImage (Fig. 6). O procedimento de medida foi realizado nas seguintes etapas:

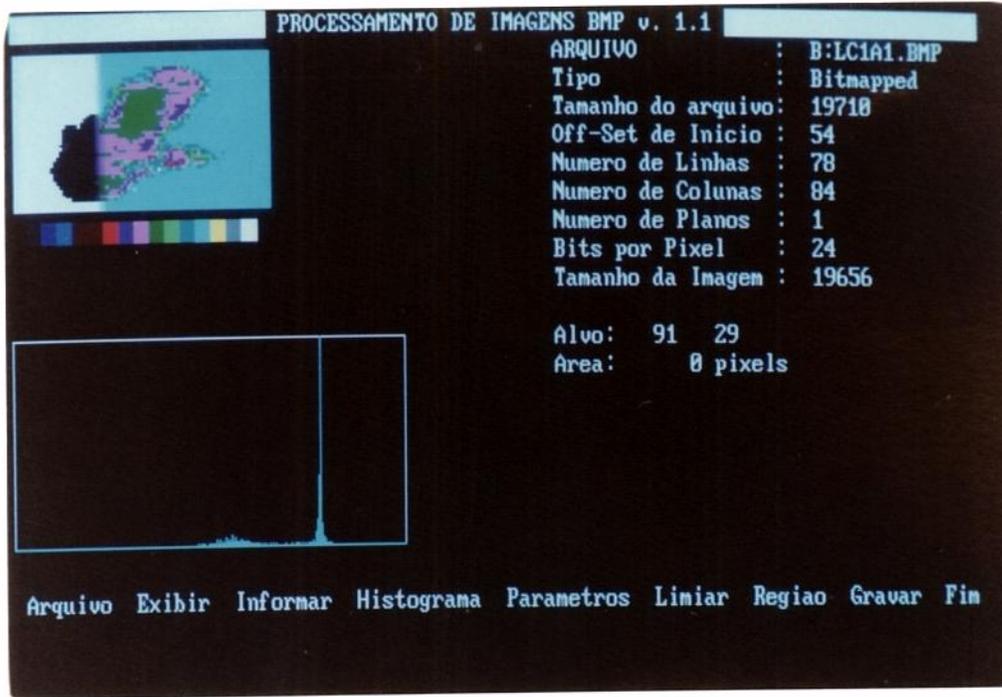
1. O arquivo BMP, gerado pelo sistema de aquisição de vídeo, foi carregado na memória, a partir do disco, e sua imagem exibida na tela, usando-se um esquema de 16 níveis de falsa-cor.
2. O histograma de níveis de luminância presentes na imagem era calculado e exibido da seguinte maneira: o nível de luminância de cada pixel foi calculado com base na média aritmética simples da luminância absoluta nas faixas vermelha (R), verde (G) e azul (B) da imagem de 24 bits, resultando em 256 valores possíveis (0 a 255), uma vez que nessa modalidade de imagem cada faixa é representada por um pixel de 8 bits de profundidade. O número de pixels na imagem, apresentando um determinado valor de luminância $[0,255]$, consistiu em uma das colunas do histograma.
3. O histograma assim obtido foi sempre bimodal. O primeiro pico representou a gama de pixels de menor intensidade, correspondentes à área do tecido, ao passo que o segundo pico representou a gama de pixels de maior intensidade, correspondentes à área de fundo (a imagem foi positiva). A partir do histograma, o operador selecionou visualmente a área de segmentação da imagem, digitando dois valores de limiar: um para a delimitação do pico de

tecido à esquerda (menores luminâncias) e outro para a delimitação à direita (maiores luminâncias).

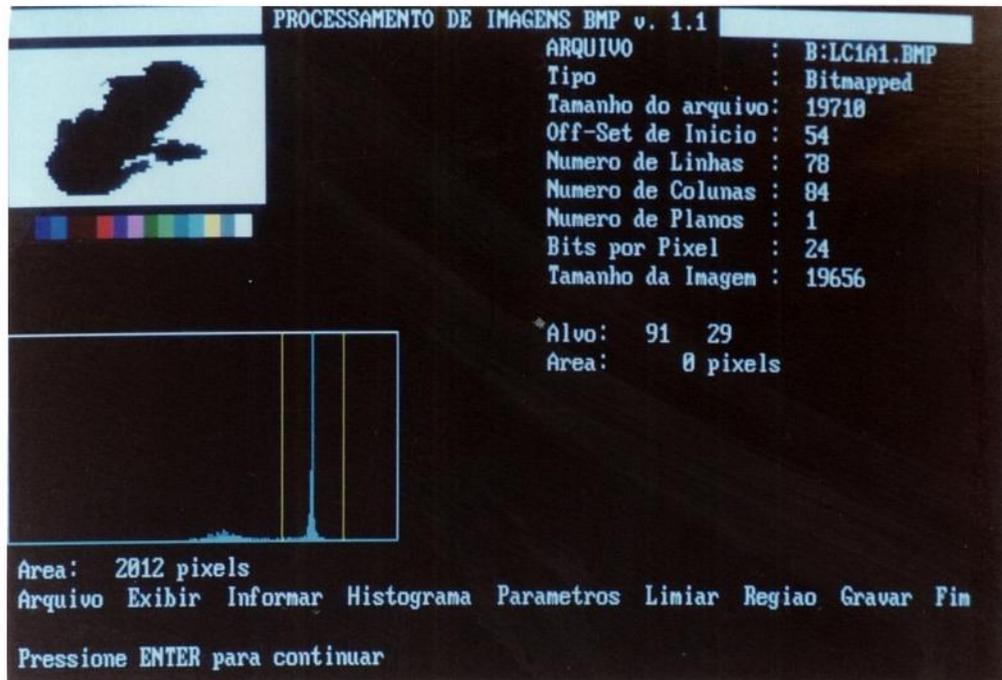
4. Empregando-se esses valores, com a ajuda deste programa, segmentou-se a imagem, convertendo-se cada pixel de 256 níveis para 2 níveis apenas (preto e branco), através do processo denominado de limiarização (PAVLIDIS, 1982). Esse processo permitiu uma estimativa inicial da área do tecido, através da contagem de pixels, convertidos para o nível preto, e podia ser repetido várias vezes, até que se atingisse uma segmentação adequada, por controle visual dinâmico da tela. Caso o operador não percebesse por inspeção visual, a inclusão de áreas de tecido não linfático (por exemplo, o pedículo do gânglio linfático) na área de segmentação, esse valor era informado como uma medida relativa de área observada.

5. Uma medida mais precisa da área podia ser obtida, nos casos em que tecido não linfático foi incluído na área limiarizada, através de um processo automático adicional, denominado crescimento por região (PAVLIDIS, 1982). Para esse fim, o observador deslocou manualmente um cursor em forma de cruz, colocando-o no centro da região segmentada de interesse e marcando na tela o pixel correspondente. O algoritmo automático de crescimento por região, calculava, então, a área da seguinte maneira: para cada pixel marcado na tela, examinavam-se, consecutivamente, os 8 pixels adjacentes ao mesmo (denominados vizinhos). Se um vizinho apresentasse o mesmo nível de cinza do pixel marcado, ele era acrescido à lista de pixels marcados. Esse procedimento foi repetido até que todos os pixels de mesmo nível fossem marcados. Dessa forma, a área demarcada "crescia" na tela, e o número de

pixels marcados era empregado como medida relativa de área, registrando-se o seu valor.



a)



b)

Figura 6 - a) BMPImage efetuando a leitura da imagem b) BMPImage após completada a leitura da imagem, mostrando o número total de pixels

11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medidas de área das estruturas foram expressas em número de pixels. Os valores registrados da área de cada gânglio linfático foram digitados em uma base de dados montada com o auxílio do programa EPI-INFO 5.0 (Centers for Disease Control, E.U.A.)

Com o objetivo de trazer à normalidade os dados brutos da pesquisa, trabalhou-se com o logaritmo das medidas. Empregou-se o teste t de Student para se comparar as médias dos grupos tratados com as médias dos grupos controle em cada período de observação pós injeção dos animais (1, 3, 7, 9, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 270, 365). O processamento gráfico e estatístico adicional foi realizado com o auxílio do programa EXCEL 3.0 (Microsoft, Inc., E.U.A)

Hipótese de Nulidade - $H_0: \mu_1 = \mu_2$

Animais dos grupos tratados com silicona exibem gânglios linfáticos axilares e inguinais com dimensão média (μ_1) semelhante às dos gânglios linfáticos dos animais dos grupos controle (μ_2 .)

Hipótese Alternativa - $H_a: \mu_1 \neq \mu_2$

Gânglios linfáticos axilares e inguinais dos animais tratados com silicona gel possuem dimensão média (μ_1) diferente dos gânglios linfáticos dos animais controle (μ_2).

Teste Estatístico

O estudo requereu uma prova estatística para determinar a significância da diferença entre duas amostras independentes, a cada período de observação.

Como as amostras continham número variado de elementos e supondo-se que a variável contínua após transformação logarítmica apresentasse uma distribuição normal, escolheu-se o teste paramétrico t de Student por ser mais rigoroso na rejeição de H_0 que os não paramétricos.

Nível de Significância

$\alpha = 0,05$

Distribuição Amostral

Normal

Região de Rejeição

Bilateral - H_0 será rejeitada se os valores de t observados forem de magnitude tal que a probabilidade associada à sua ocorrência, sob H_0 , seja igual ou superior ao valor de t crítico, isto é, ao nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

1. MACROSCOPIA

A análise macroscópica, à necropsia, mostrou a presença de uma protuberância no dorso e outra no abdome, correspondendo às lojas de silicose.

À dissecação, não se notaram alterações macroscópicas dos gânglios linfáticos.

Considerando as dificuldades surgidas na identificação de alguns animais e de parte do material, no processo de preparação das lâminas, foram eliminados do estudo três animais do grupo tratado (dois do grupo de 365 e um do grupo de 270 dias) e oito animais do grupo controle (três do grupo de 365, três do grupo de 120, um do grupo de 270 e um do grupo de 60 dias).

2. ANÁLISE MORFOLÓGICA

Os gânglios linfáticos foram incluídos em parafina ao acaso em virtude de suas dimensões reduzidas. Desta forma, a incidência do corte histológico não foi padronizada, com variação do ângulo e profundidade das secções. A amostra foi composta de 753 gânglios linfáticos de 152 animais dos grupos tratado e controle. Foram analisados 169 gânglios linfáticos da região axilar direita, 190 da região axilar esquerda, 210 da região inguinal direita e 144 da região inguinal esquerda. Quarenta e três linfonodos não foram classificados de acordo com a região anatômica.

Em nenhum dos cortes foi possível identificar a presença de figuras fagocíticas, como células gigantes, polimorfonucleares ou histiócitos com vacúolos

evidentes ou de substâncias estranhas que pudessem sugerir a presença de sílica nos gânglios linfáticos.

Tanto nos animais tratados como nos animais controle, observou-se a presença de raros histiócitos com citoplasma espumoso, claro e abundante e contornos regulares, nos sinus cortical, medular e região hilar.

Notou-se a presença também, nos grupos tratado e controle, de mastócitos na região cortical, no sinus ou nas suas proximidades e ainda, em algumas amostras, a presença de células reticulares hiperplásicas.

Tanto nos animais do grupo tratado quanto nos animais do grupo controle observaram-se vasos sanguíneos com células endoteliais proeminentes.

Centros germinativos secundários não foram vistos nem nos animais dos grupos tratados como tampouco nos animais controle (Figuras 7, 8, 9, 10).

Em ambos os grupos observou-se a presença de pigmento amarelado no citoplasma de histiócitos. Foram feitos novos cortes sob coloração pelo azul da Prússia mostrando tratar-se de hemosiderina.

Não foram encontrados gânglios linfáticos em todos os cortes, sendo que em alguns casos, apenas tecido fibroadiposo e glândulas apócrinas puderam ser identificados.

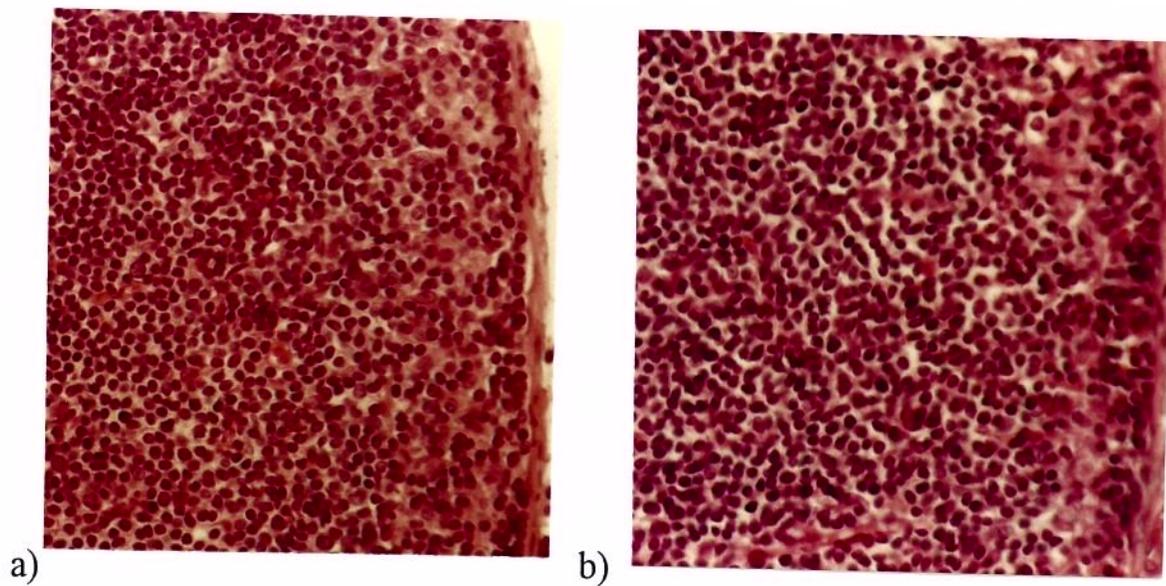


Figura 7. - Aspecto microscópico de um gânglio linfático aos 7 dias após a injeção: a) animal tratado b) animal controle (H.E; aumento: 320 X)

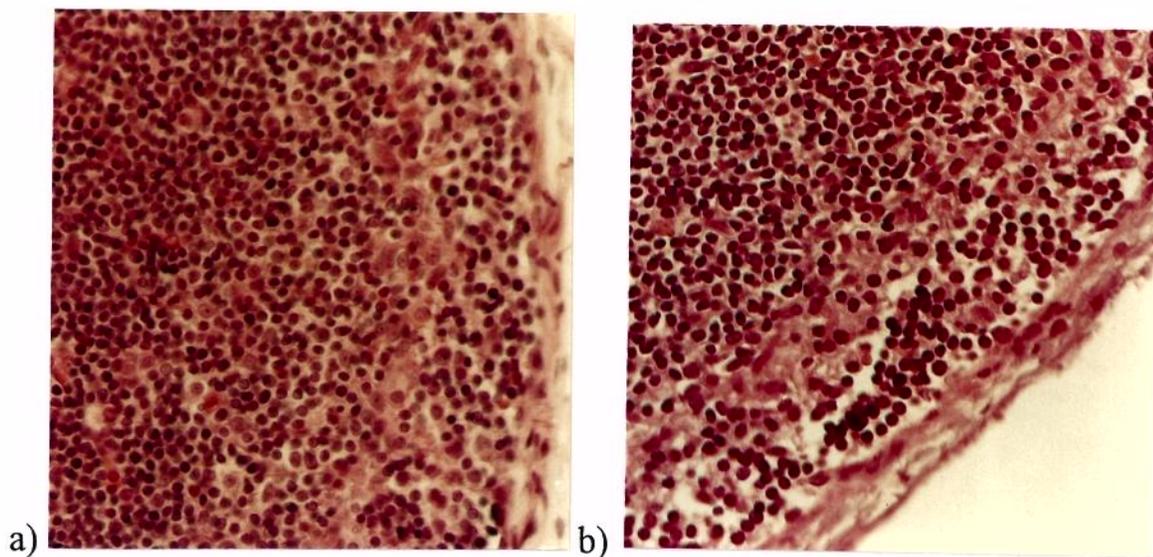


Figura 8. - Aspecto microscópico de um gânglio linfático aos 30 dias após a injeção: a) animal tratado b) animal controle (H.E; aumento: 320 X)

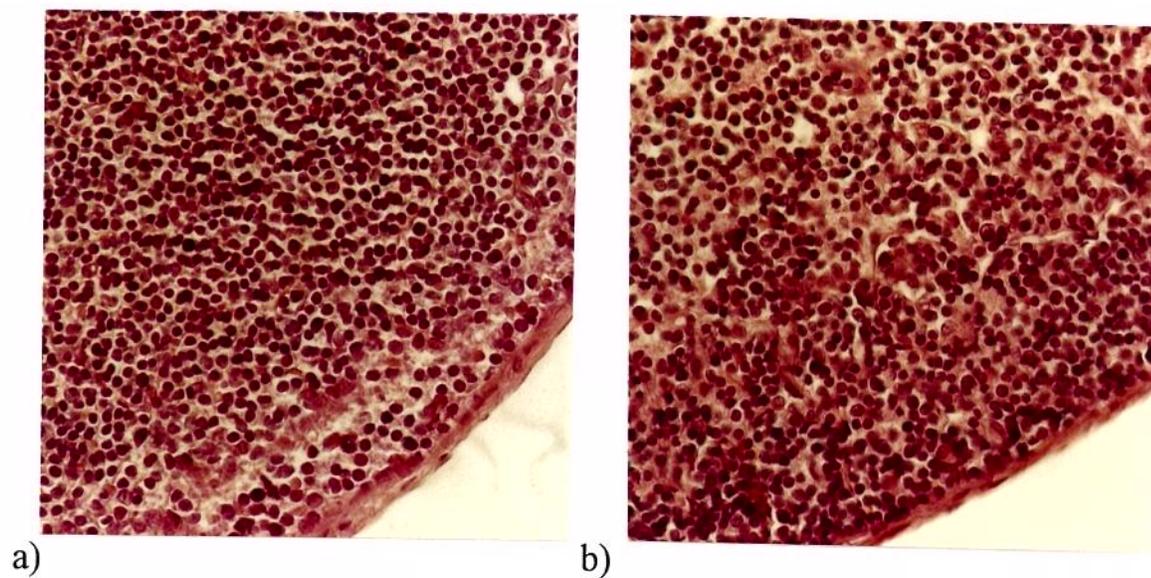


Figura 9. - Aspecto microscópico de um gânglio linfático aos 90 dias após a injeção: a) animal tratado b) animal controle (H.E; aumento: 320 X)

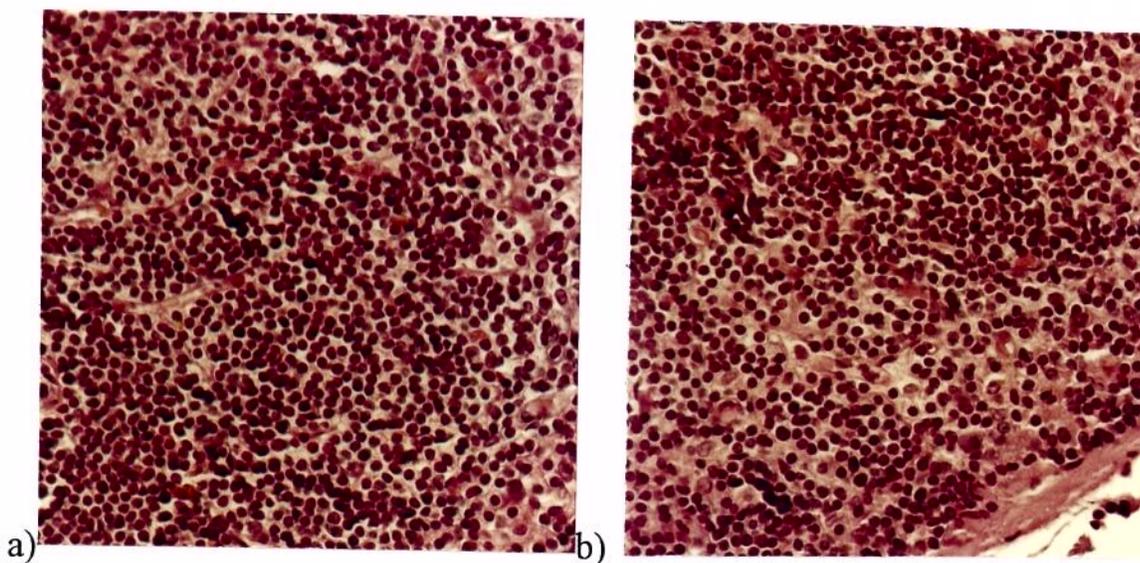


Figura 10. - Aspecto microscópico de um gânglio linfático aos 365 dias após a injeção: a) animal tratado b) animal controle (H.E; aumento: 320 X)

3. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Não foram observadas diferenças significativas ao nível de 0,05 nas medidas de área dos cortes dos gânglios linfáticos quando se compararam os grupos tratados com os grupos controle, empregando-se o teste t de Student (Tabela 2).

No grupo de animais sacrificados aos 90 dias após a injeção observou-se uma diferença significativa entre a medida das áreas dos linfonodos dos animais do grupo tratado comparativamente aos do grupo controle . A variância para o grupo tratado foi 0,165 com desvio padrão 0,146, enquanto que no grupo controle a variância foi 0,297 e o desvio padrão 0,545. A média mostrou-se maior no grupo tratado (3,498) relativamente ao grupo controle (3,263).

Tabela 2 - Análise estatística da área de secção dos gânglios linfáticos dos animais tratados e controle

Dias	T/C	N	Média	D. P.	t de Student	p
1	T	22	3,127	0,391	0,147	p>0,05
1	C	17	3,195	0,331		
3	T	12	3,251	0,327	0,26	p>0,05
3	C	16	3,221	0,262		
7	T	14	3,099	0,206	0,93	p>0,05
7	C	15	3,2	0,363		
9	T	17	3,171	0,397	1,977	p>0,05
9	C	16	3,421	0,328		
15	T	18	3,111	0,545	1,101	p>0,05
15	C	24	3,274	0,364		
30	T	32	3,247	0,339	1,81	p>0,05
30	C	24	3,058	0,417		
60	T	40	3,197	0,48	0,804	p>0,05
60	C	83	3,122	0,495		
90	T	67	3,501	0,393	2,577	p<0,05
90	C	46	3,269	0,517		
120	T	37	3,361	0,367	1,045	p>0,05
120	C	35	3,451	0,374		
180	T	80	3,266	0,56	1,287	p>0,05
180	C	40	3,405	0,559		
270	T	21	3,231	0,121	0,723	p>0,05
270	C	36	3,153	0,222		
365	T	16	3,161	0,393	0,303	p>0,05
365	C	25	3,201	0,442		

N = número de gânglios linfáticos

D.P = Desvio Padrão

T/C = Tratado Controle

Um animal do grupo controle cujo sacrificio se faria aos 270 dias após a injeção foi encontrado morto 60 dias após a data da injeção de água destilada. À necropsia observou-se tumoração pulmonar com secreção purusanguinolenta, que aos cortes dava saída a material de aspecto fibrinohemorrágico.

Um animal do grupo tratado cujo sacrificio se faria aos 270 dias após injeção foi sacrificado aos 80 dias, visto que apresentava sinais de doença com secreção sero-sanguinolenta nas narinas e região ocular . Não se observou alterações à necropsia.

Do grupo de animais tratados cujo sacrificio se faria aos 365 dias pós injeção, um animal apresentou sinais de doença, com dificuldade respiratória e dificuldade de movimentação das patas traseiras, 310 dias contados a partir da data da injeção de silicona. Na manhã seguinte, foi encontrado morto. À necropsia, o pulmão apresentava sinais de congestão, e nas narinas e nos olhos foi observada secreção serosanguinolenta.

DISCUSSÃO

1. DESENVOLVIMENTO DE UMA SERINGA ESPECIAL

A técnica de injeção do gel de silicona foi testada previamente, num estudo piloto a fim de se padronizar o método. Até então, a intenção era utilizar uma seringa empregada em lipoaspiração disponível no Hospital da SOBRAPAR.

Devido à elevada viscosidade da silicona gel houve grande dificuldade em se fazer com que o material fluísse pela agulha. Apesar do sistema de alavanca denteada, o que, teoricamente, deveria impedir o refluxo do material, observava-se que o êmbolo era impelido para trás.

Além disso, um outro fato, descrito a seguir, contribuiu para o desenvolvimento de um instrumento mais apropriado. Após ter sido injetada uma certa quantidade de material em alguns animais do estudo piloto, a seringa foi deixada sobre a bancada do laboratório, contendo ainda alguns mililitros de silicona no seu interior. Alguns dias depois, observou-se que a silicona havia sofrido uma alteração importante de coloração (figura 11). O material que originalmente é incolor, assumiu uma coloração alaranjada.

A princípio tal alteração foi associada à elevada temperatura à qual o material foi exposto, uma vez que através de uma janela de vidro, a bancada recebia radiação solar durante todo o período vespertino. No entanto, esta hipótese foi descartada pois, certamente, a temperatura de esterilização (130 graus Celsius) da silicona é muito superior. Com o intuito de se detectarem outros fatores que pudessem estar envolvidos, observou-se que a seringa tinha seu corpo de acrílico transparente, mas a parte interna era confeccionada de borracha natural.



Figura 11 - Seringa empregada no início do experimento contendo silicona com coloração alterada

Ao ser consultado o Professor Nelson Bolzani da área de Desenvolvimento de Tecnologias do Centro de Pesquisas da SOBRAPAR, tomou-se conhecimento de que a borracha natural não é recomendada para esta finalidade pois ela é passível de eliminar componentes químicos que irão interagir com as substâncias colocadas em contacto.

Com base nestas considerações, decidiu-se aproveitar o corpo principal da seringa e desenvolver um novo sistema, onde o êmbolo deslizaria em função de uma rosca, diminuindo, com isso, o esforço do pesquisador na injeção do material. As borrachas foram substituídas por teflon, material indicado, inclusive, na fabricação de equipamentos para o setor alimentício.

Com o novo instrumento, o procedimento de injeção dos animais tornou-se muito menos desgastante para o pesquisador, ao mesmo tempo em que diminuiu o tempo de anestesia do animal. Além destes benefícios, por si somente já bastante gratificantes, não mais foram observados episódios de alteração da silicona, aos novos testes em iguais condições.

2. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A análise da literatura indexada disponível mostrou a inexistência de estudos dirigidos especificamente às alterações produzidas nos gânglios linfáticos, pela presença de silicona gel no organismo. No âmbito da patologia experimental encontrou-se tão somente o trabalho de BARKER & SCHULTZ (1978). Estes autores examinaram, incidentalmente, os gânglios linfáticos de 13 animais, quando estudavam a cápsula fibrosa formada ao redor de implantes de silicona gel, não tendo sido encontrada nenhuma alteração. No entanto, não se tratou de um estudo sistemático e controlado que permitisse conclusões fidedignas quanto aos seus achados.

Tendo em vista que os gânglios linfáticos, vencida a resposta inflamatória local, constituem a primeira barreira para agentes estranhos ao organismo se disseminarem através da corrente sangüínea, considerou-se relevante estudar os padrões morfológicos destas estruturas em resposta aos implantes de silicona gel, no organismo de ratos.

A dificuldade de se identificar e dissecar os pequenos gânglios linfáticos, em meio ao tecido envolvente fez com que, em alguns casos, fosse observado somente tecido fibro adiposo nos cortes histológicos.

Pelas mesmas razões tornou-se muito difícil identificar alterações macroscópicas daquelas estruturas.

Os cortes histológicos foram orientados ao acaso, não padronizando a incidência e nem tampouco a profundidade dos cortes, em função do tamanho

das estruturas. No entanto, tanto no grupo de animais tratados quanto no grupo de animais controle, o procedimento adotado foi o mesmo, tornando-se possível a comparação das amostras, na análise qualitativa e quantitativa.

No presente estudo não foram identificadas células gigantes ou histiócitos com características morfológicas de atividade fagocitária contendo material estranho, nem tampouco vacúolos que pudessem sugerir a presença de material estranho, tanto no grupo tratado quanto no grupo controle, em nenhum dos períodos analisados.

Observaram-se histiócitos com citoplasma claro, espumoso e abundante, com contornos regulares, nos sinus cortical, medular e região hilar nos gânglios linfáticos dos animais tratados e dos animais do grupo controle, permitindo concluir que a presença destes histiócitos não foi consequência da sílica implantada no organismo.

A fagocitose pelos macrófagos constitui a primeira etapa da resposta imune e representa uma reação não específica a corpos estranhos. Quando ativados, os macrófagos são importantes liberadores de mediadores da resposta inflamatória, especialmente da interleucina 1 (IL-1), que é um potente estimulante de outras células no processo reparativo. Se a sílica houvesse chegado aos gânglios linfáticos e se os macrófagos a fagocitassem esperar-se-ia detectar a presença de vacúolos,

A presença dos histiócitos, portanto, provavelmente se insere num padrão morfológico de normalidade, em resposta aos agentes ambientais, uma vez que praticamente todos os animais exibiram estes achados. Para confirmar esta

hipótese, no entanto, será necessário examinar os gânglios linfáticos de uma amostragem maior de animais, analisando a morfologia dos gânglios linfáticos de animais na presença ou não do trauma cirúrgico, presente mesmo nos animais controle, à injeção de água destilada e lesão de tecido celular subcutâneo e, na ausência de patógenos comparando-se os achados aos dos animais criados em condições ambientais livres de patógenos.

Células reticulares e endoteliais hiperplásicas podem ser interpretadas como parte do processo reacional dos gânglios linfáticos. Note-se, no entanto, que elas ocorreram de forma eventual e não foram acompanhadas de hiperplasia de folículos linfóides ou de aumento aparente da celularidade. Além disso, foram encontradas também nos animais do grupo controle, o que confirma não estarem relacionadas à presença da sílica.

Verificou-se a presença de hemosiderina em animais dos diferentes períodos de observação, tratados e controle. A sua presença pode ser decorrente da lesão tecidual provocada no momento da injeção, com rompimento vascular e destruição de hemáceas.

Os achados do presente estudo não confirmam as suposições de alguns trabalhos analisados na revisão da literatura que sugerem que ocorra a migração da sílica gel para os gânglios linfáticos com conseqüente linfadenopatia

Dentre as publicações analisadas destaca-se o trabalho de WINTSCH SMAHEL, CLODIUS (1978). Os autores encontraram sílica em um gânglio linfático de uma paciente com implante mamário. No entanto, o referido

implante era recoberto por poliuretano, que constitui uma outra variável, que pode mudar completamente a característica da resposta inflamatória e imunológica.

HAUSNER , SCHOEN, PIERSON (1978) e HAUSNER et al. (1981) descrevem linfadenopatia, com presença de células gigantes multinucleadas e material estranho, em pacientes que removeram implantes mamários de silicona gel devido à ocorrência de tumoração das mamas. Note-se entretanto que, a ocorrência de câncer na região de drenagem dos gânglios linfáticos pode produzir alterações morfológicas que se confundem com as alterações produzidas pela silicona. Por exemplo, TRUONG et al. (1988), examinando os gânglios linfáticos de pacientes mastectomizadas em decorrência de câncer mamário, que não haviam sido submetidas a injeção ou implante de silicona, observaram, em 34% das amostras, a presença de vacúolos grosseiros, preenchidos provavelmente com gordura e uma célula gigante multinucleada em um caso (0,3%).

LIN, DILEONARDO, JACOBY (1993) descreveram sucintamente o achado de linfadenopatia associada à presença de silicona gel no organismo. Os vacúolos presentes nos histiócitos poderiam ser decorrentes de outras condições clínicas sem uma relação direta com a presença de silicona.

TRUONG et al. (1988) estudando os efeitos da silicona nos gânglios linfáticos de seres humanos não fazem uma distinção clara quanto aos resultados encontrados em indivíduos que haviam se submetido à injeção de silicona líquida comparativamente à colocação de implantes mamários de silicona gel. A mesma dificuldade encontra-se ao se analisar o trabalho de TABATOWSKI,

CRAIG, JOHNSTON (1990) que descreve reação granulomatosa de corpo estranho em paciente submetida a mamoplastia de aumento, sem esclarecer, no entanto, o tipo de implante empregado.

O trabalho de GOIN (1978) descreve os achados de uma paciente que teve o implante mamário roto com posterior aparecimento de coleção de silicone nas axilas. A análise microscópica do gânglio linfático axilar mostrou reação granulomatosa de corpo estranho com vacúolos contendo material identificado como silicone por espectroscopia infravermelho do extrato do material. Este evento parece caracterizar uma exceção, pela raridade com que foi descrito na literatura. No entanto, a reação granulomatosa observada poderia ser uma resposta às partículas do elastômero de silicone e não ao gel. Esta hipótese encontra apoio nos relatos de casos de linfadenopatias associadas a artroplastias onde o agente causal supostamente é o elastômero de silicone, que se assemelha à membrana dos implantes de silicone gel.

No que diz respeito aos elastômeros, é necessário chamar a atenção para o número expressivo de trabalhos (CHRISTIE, WEINBERGER, DIETRICH, 1977; CHRISTIE, WEINBERGER, DIETRICH, 1981; ABRAHAM & ETZ, 1979; GROFF, SCHNED, TAYLOR, 1981; DIGBY, 1982; BENJAMIN et al., 1982; CORRIN, 1982; SHIEL & JASON, 1986; ROGERS et al., 1988; MURAKATA & RANGWALA, 1989; KIRCHER, 1990) indicando uma provável associação entre os implantes articulares de silicone e a ocorrência de linfadenopatia. Este aspecto, associado à ausência de alterações na estrutura dos gânglios linfáticos, na presença de silicone gel, além da ocorrência eventual de linfadenopatia em pacientes com implantes mamários de silicone gel, permite concluir que a silicone na forma de elastômero possivelmente é o

agente que está provocando uma reação mais intensa do organismo relativamente à própria silicona gel.

Ao analisar-se o processo de obtenção das diferentes formas de apresentação das siliconas, nota-se que os elastômeros são submetidos a um tratamento químico mais intenso a fim de se obter um maior grau de polimerização de suas cadeias. Além disso, apesar de flexíveis, as siliconas possuem baixa resistência mecânica. Para aumentar a resistência dos elastômeros e diminuir a sua permeabilidade, durante a fabricação são adicionados grupos funcionais às cadeias de silicona, sendo o mais comum o grupo funcional SiO₃ (sílica). RUDOLPH et al. (1978) estudaram a resposta inflamatória local aos implantes salinos e não observaram fagocitose de silicona no tecido fibroso envolvente. No entanto, este estudo não encerra as possibilidades do elastômero ser o agente causal das linfadenopatias. Especialmente porque nos últimos anos, com a preocupação de tornar o envelope do implante menos permeável, como já fora mencionado no parágrafo anterior, foram realizadas modificações na produção dos elastômeros.

Para dirimir estas dúvidas é necessário que se proceda a uma investigação experimental, comparando a resposta do organismo às siliconas nos seus diferentes estados: líquido, gel e elastômero.

Pacientes submetidos a artroplastia são, em sua grande maioria, portadores de doença auto-imune. E, assim como em pacientes com câncer, existe a possibilidade de que a resposta imunológica aos implantes também esteja modificada. Há que se considerar também que os implantes articulares estão

sujeitos a atrito e a forças de tensão mais intensas que os implantes subcutâneos.

O encontro dos anticorpos aos parvovírus Kilham Rat Virus e Toolan na colônia não parece prejudicar o experimento, uma vez que os animais não apresentaram sinais aparentes de doença. Os vírus latentes podem ser ativados em caso de imunossupressão (JACOBY, R.O.; BHATT, P.N.; JONAS, A.M., 1979). O fato de não ter ocorrido a manifestação de sinais típicos de doença pelos parvovírus do rato indica que a sílica não produziu modificação da resposta imune ou imunossupressão nos animais estudados.

Acredita-se que na presença do *Syphacia muris*, que é um oxiurídeo, não há maiores prejuízos à colônia, exceto por certa irritabilidade e sinais de desconforto nos animais. Entretanto, durante todo o período de observação experimental, nada de anormal foi detectado.

A morte do animal do grupo controle de 270 dias, ocorrida 60 dias após a injeção com água destilada, deveu-se provavelmente a um processo infeccioso, num evento isolado, uma vez que não foram encontrados outros animais afetados na colônia.

O sacrifício do animal tratado do grupo de 270 dias aconteceu em função de um cuidado extremo em se detectar contaminação da colônia precocemente. A necrópsia e os testes sorológicos não mostraram quaisquer alterações. O animal, provavelmente, expressava sinais de irritação ao hipoclorito de sódio empregado na desinfecção do laboratório. Outros animais exibiram sinais mais discretos desta irritação. Ao substituímos o hipoclorito de sódio por

quaternário de amônia, os sinais desapareceram. O animal encontrado morto 310 dias após o início do experimento, parece ter desenvolvido um quadro infeccioso agudo. O longo período em que foi mantido no laboratório aumenta as possibilidades de ocorrência de infecção.

CONCLUSÕES

1. Não foram observadas alterações morfológicas por microscopia óptica comum, sugestivas de processo reacional, em gânglios linfáticos axilares e inguinais de ratos Wistar submetidos a injeção subcutânea de silicona gel, quando comparados a gânglios linfáticos de animais controle.

2. Não foram observadas evidências de migração de silicona gel para gânglios linfáticos axilares e inguinais de ratos submetidos à injeção subcutânea de silicona gel.

3. Não foram observadas diferenças significativas de tamanho dos gânglios linfáticos axilares e inguinais de ratos Wistar submetidos a injeção subcutânea de silicona gel quando comparados com gânglios linfáticos de animais-controle, em diferentes períodos, entre 1 e 365 dias de observação, com exceção do período de 90 dias. Se a migração da silicona para os linfonodos ocorreu, não se detectaram manifestações morfológicas indicativas de reação à sua presença como, tampouco, hiperplasia dos linfonodos.

RESUMO

O gel dos implantes de silicona pode entrar em contacto direto com o organismo em decorrência do vazamento através da membrana elastomérica do implante ou devido à rotura desta membrana. Estudou-se os efeitos da silicona gel livre injetada no tecido subcutâneo de ratos. Analisou-se as características morfológicas dos gânglios linfáticos axilares e inguinais. Foram injetados 3 cm³ de silicona gel no tecido subcutâneo de 96 ratos Wistar. Os animais do grupo controle (96 ratos Wistar) receberam injeção subcutânea de água destilada. Oito animais tratados e oito animais controle foram sacrificados decorridos 1, 3, 7, 9, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 270 e 365 dias da injeção. Não foram observadas alterações morfológicas nos gânglios linfáticos sugestivas de migração ou de resposta reacional à silicona gel. Pequenas quantidades não detectáveis de silicona poderiam migrar para os gânglios linfáticos e provocar hiperplasia daquelas estruturas. Para avaliar esta possibilidade fêz-se um estudo morfométrico auxiliado por computador, onde comparou-se a área dos cortes dos gânglios linfáticos dos animais tratados com os do grupo controle. A análise estatística não mostrou diferenças significativas entre o grupo tratado e o controle. Se ocorreu migração de silicona, não provocou manifestação morfológica de hiperplasia dos gânglios linfáticos.

ABSTRACT

The gel of the silicone gel implants may bleed through the elastomeric envelope or may enter in contact with the organism due to a rupture of the implant. It was studied the effects of free silicone gel injected into the subcutaneous tissue of rats. It was analysed the morphologic features of the axilar and inguinal lymph nodes. Ninety six Wistar rats were injected in their subcutaneous space with 3 cm³ of silicone gel. The animals of control group, ninety six Wistar rats, were injected in their subcutaneous space with distilled water. The animals were sacrificed on days: 1, 3, 7, 9, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 270 and 365 after the injection. There was no detectable silicone and no damage to the lymph nodes based on routine histopathological analysis. Little amounts of silicone that could migrate to lymph nodes could result in hyperplasia. In order to evaluate this possibility, a morphometric study based on a computer aided system compared the area of lymph node sections between treated and control animals. The statistical analysis didn't show any difference between treated and control groups. If silicone migration occurred it did not provoke morphologic manifestation or hyperplasia of the lymph nodes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, J. L. & ETZ, E. S. - Molecular microanalysis of pathological specimens in situ with a Laser Raman microprobe. **Science** 206:716-718, 1979.
- AMARAL, C.M.R.; NICOLA, J.U.; BUENO, M.A.C.; NUNES, P.H.F.; COUTO, R.M.; TIZIANI, V. - Investigation of capsular contraction of silicone gel mammary prosthesis by optical absorption and raman laser spectroscopy ". **Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica** 5(1):1-7, 1990.
- AMARAL, C.M.R.; TIZIANI, V.; TREVISAN, M.A.S.; PIRES, C.H.; PALHARES, F.B. - Capsular contracture silicone gel - experimental study. **Aesthetic Plastic Surgery**, 16:261-264, 1992.
- AMARAL, C.M.R.; TIZIANI, V.; CINTRA, M.L.; AMSTALDEN, I; PALHARES, F.B. - Local reaction and migration of injected silicone gel-experimental study. **Aesthetic Plastic Surgery** 17:335-338, 1993.
- ANDREWS J.M. - Cellular behavior to injected silicone fluid - a preliminary report. **Plast. Reconstr. Surg.**, 38(6):581-583, 1966.
- BARKER, D.E. & SCHULTZ, S.L. - Reaction to silicone implants in the guinea pig". **Aesthetic Plastic Surgery.**, 1:371-378, 1978.
- BARKER, D.E.; RETSKY, M.I.; SCHULTZ,S. - Bleeding of silicone from bag-gel breast implants and it's clinical relation to fibrous capsule reaction. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 61(6):836-841, 1978
- BARKER, D. E.; RETSKY, M. SEARLES, S.L. - New low bleed implant - Silastic II. **Aesthetic Plastic Surgery** 9:39-41, 1985
- BARRETT, D.M.; O'SULLIVAN, D.C.; MALIZIA, A.A.; REIMAN, H.B.; ABELL-ALEFF, P.C.- Particle shedding and migration from silicone genitourinary prosthetic devices. **The Journal of Urology**. 146:319-322, 1991.
- BENJAMIN, E.; AHMED, A.; RASHID, A.T.M.F.; WRIGHT, D.H. - Silicone lymphadenopathy: a report of two cases, one with concomittant malignant lymphoma. **Diagnostic Histopathology** 5:133-141, 1982.

- BERGMAN, R.B. & Van der ENDE, A.E. - Exudation of silicone through the envelope of gel filled breast prostheses: an in vitro study. **British Journal of Plastic Surgery** 32:31-34, 1979.
- BOO CHAI, K. - The complications of augmentation mammoplasty by silicone injection. **British Journal of Plastic Surgery** 22:281-285, 1969.
- BRALEY, S. A. - The use of silicones in plastic surgery - a retrospective view . **Plastic and Reconstructive Surgery** 51(3): 280 - 288, 1973.
- CAMARA, D. L.; SHERIDAN, J.M.; KAMMER, B.A. - Rupture and aging of silicone gel breast implants. **Plastic and Reconstructive Surgery** 91(5):828-834, 1993.
- CHRISTIE, A.J.; WEINBERGER, K.A.; DIETRICH, M. - Silicone lymphadenopathy and synovitis - complications of silicone elastomer finger joint prostheses. **JAMA** 237(14):1463-1464, 1977.
- CHRISTIE, A.J.; WEINBERGER, K.A.; DIETRICH, M. - Recurrence of silicone lymphadenopathy. **JAMA** 245(13):1314, 1981 (letter)
- CORRIN, B. - Silicone lymphadenopathy. **J. Clin. Pathol.** 35:901-902, 1982 [letter]
- CRONIN, T.D. & GEROW, F.J. - Augmentation mammoplasty: a new "natural feel prosthesis". Washington D.C. Proceedings of the IIIrd International Congress of Plastic Surgery, 1963.
- DESTOUET, J. M.; MONSEES, B.S.; OSER, R.F.; NEMECECK, J. R.; YOUNG, U.L.; PILGRAM, T.K. - Screening mammography in 350 women with breast implants: prevalence and finding of implant complications. **American Journal of Roentgenology.** 159:973-978, 1992
- DIGBY, J.M. - Malignant lymphoma with intranodal silicone rubber particles following metacarpophalangeal joint replacement. **The Hand** 14(3):326-328, 1982.

- ELLENBOGEN, R.; ELLENBOGEN, R.; RUBIN, L. - Injectable fluid silicone therapy: human morbidity and mortality. **Journal of the American Medical Association**. 234(3):308-309, 1975.
- FERREIRA, M.C.F; SPINA, V; IRIYA, K. - Changes in the lung following injections of silicone gel. **British Journal of Plastic Surgery** 28:173-176, 1975
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - **Panel issue breast recommendations** T 91- 72, Nov-15, 1991.
- GOIN, J. M. - High- pressure injection of silicone gel into an axilla - a complication of closed compression capsulotomy of the breast. **Plastic and Reconstructive Surgery** 62(6):891-895, 1978.
- GROFF,G.D.; SCHNED, A.R.; TAYLOR, T.H. - Silicone induced adenopathy eight years after metacarpophalangeal arthroplasty. **Arthritis and Rheumatism** 24(12):1578-1581, 1981.
- HAKÉLIUS, L. & OHLSÉN, L. - A clinical comparison on the tendency to capsular contracture between smooth and textured gel-filled silicone mammary implants. **Plastic and Reconstructive Surgery** 90(2):247-254, 1992.
- HAUSNER, R.J.; SCHOEN, F.J.; PIERSON, K.K. - Foreign body reaction to silicone gel in axillary lymph nodes after an augmentation mammoplasty. **Plastic and Reconstructive Surgery** 62(3):381-384, 1978.
- HAUSNER, R.J.; SCHOEN, F.J.; MENDEZ-FERNANDEZ, M.A.; HENLY, W.S.; GEIS, R.C. - Migration of silicone gel to axillary lymph nodes after prosthetic mammoplasty. **Arch. Pathol. Lab. Med.** 105:371-372, 1981.
- JACOBY, R.O.; BHATT, P.N.; JONAS, A.M. In: BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R.; WEISBROTH, S.H., **The laboratory rat. - Biology and Diseases** San Diego, Academic Press Inc., 1979.p. 271-306.
- KIRCHER, T.- Silicone lymphadenopathy: a complication of silicone elastomer finger joint prostheses. **Human Pathology** 11(3):240-244, 1980.

- KOSSOVSKY, N.; COLE, P.; ZACKSON, D.A. - Giant cell myocarditis associated with silicone - an unusual case of biomaterials pathology discovered at autopsy using X-ray energy spectroscopic techniques. **Am. J. Clin. Pathol.**, 93(1):148-152, 1990.
- LIN, R.P.; DILEONARDO, M.; JACOBY, R.A. - Silicone lymphadenopathy - a case report and review of the literature. **The American Journal of Dermatopathology** 15(1):82-84, 1993.
- LEONG, A.S.Y.; DISNEY, A.P.S.; GOVE, D.W. - Spallation and migration of silicone from blood-pump tubing in patients on hemodialysis. **The New England Journal of Medicine** 306(3):135-140, 1982.
- MATLAGA, B.F.; YASENCHAK, L.P.; SALTHOUSE, T.N. - Tissue response to implanted polymers: the significance of sample shape. **J. Biomed Mater. Res.** 10:391-397, 1976.
- MURAKATA, L.A. & RANGWALA, A.F. - Silicone lymphadenopathy with concomitant malignant lymphoma. **The Journal of Rheumatology.** 16:(11): 1480-1483, 1989.
- MYIACHI, S.; NEGORO, M.; HANDA, T.; TERASHIMA, K.; KEINO, H.; SUGITA, K. - Histopathological study of balloon embolization: silicone versus latex. **Neurosurgery.**30(4):483-489, 1992.
- PALOMERO, P.M.; QUETGLAS, J; QUETGLAS, A; ORTEGA, C. G.; FERNANDEZ, P.C. - Tissue response to silicone implants- intraperitoneal, subfascial and subcutaneous experimental study in rats. **Cirurgia Plastica Ibero-Latinoamericana** 17(3):178-183, 1991
- PAVLIDIS, T. - **Graphic and image processing.** Berlin, Springer - Verlag, 1982
- PICHA, G.J. & GOLDSTEIN, J.A. - Analysis of the soft-tissue response to components used in the manufacture of breast implants - rat animal model. **Plastic and Reconstructive Surgery** 87(3):490 -500, 1991.

- RAE, V.; PARDO, R.J.; BLACKWELDER, P.L.; FALANGA, V. - Leg ulcers following subcutaneous injection of a liquid silicone preparation. **Archives of Dermatology** 125:670-673, 1989.
- REES, T.D.; BALLANTYNE, D.L.; HAWTHORNE, G.A. - Silicone fluid research: a follow up summary. **Plastic and Reconstructive Surgery** 46(1):50-56, 1970.
- ROGERS, L.A.; LONGTINE, J.A.; GARNICK, M.B.; PINKUS, G.S. - Silicone lymphadenopathy in a long distance runner: complication of a silastic prosthesis. **Human Pathology** 19(10):1237-1239, 1988.
- RUDOLPH, R.; ABRAHAM, J.; VECCHIONE, T.; GUBER, S.; WOODWARD, M. - Myofibroblasts and free silicon around breast implants. **Plastic and Reconstructive Surgery** 62(2):185-196, 1978.
- SCHMIDT, J.A. & RECUM, A.F. - Texturing of polymer surfaces at the cellular level. **Biomaterials** 12:385-389, 1991.
- SHIEL, W.C. & JASON, M. - Granulomatous inguinal lymphadenopathy after bilateral metatarsophalangeal joint silicone arthroplasty. **Foot & Ankle** 6(5):216-218, 1986.
- SMAHEL, J. - Histology of the capsules causing constrictive fibrosis around breast implants. **British Journal of Plastic Surgery**. 30:324-329, 1977.
- TABATOWSKI, K.; CRAIG, E.E.; JOHNSTON, W.W. - Silicone lymphadenopathy in a patient with a mammary prosthesis -Fine needle aspiration, cytology, histology and analytical electron microscopy. **Acta Cytologica** 34(1):10-14, 1990.
- TRUONG, L.D.; CARTWRIGHT JR., J; GOODMAN, M.D.; WOZNICKI, D. - Silicone lymphadenopathy associated with augmentation mammoplasty - morphologic features of nine cases. **The American Journal of Surgical Pathology**. 12(6):484-491,1988.
- VISTNES, L.M.; BENTLEY, J.W.; FOGARTY, D.C. - Experimental study of tissue response to ruptured gel-filled mammary prostheses. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 59(1):31 -34, 1977.

WINTSCH, W.; SMAHEL, J.; CLODIUS, L. - Local and regional lymphnode response to ruptured gel-filled mammary prostheses. **British Journal of Plastic Surgery** 31:349 -352, 1978.

NORMAS ADOTADAS

HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de dissertações e teses. São Paulo, BIREME, 1990, 45p.

APÊNDICE

Dados originais de área medida dos gânglios linfáticos (em pixels)						
ARQUIVO	TEMPO	TRATAMENTO	ANIMAL	REGIÃO	GÂNGLIO	ÁREA
AC1B1	1	C	1	B	1	987
AC1B2	1	C	1	B	2	52
AC1D1	1	C	1	D	1	6650
AC1D2	1	C	1	D	2	1348
AC2C1	1	C	2	C	1	3530
AC2C2	1	C	2	C	2	3417
AC2C3	1	C	2	C	3	2659
AC2C4	1	C	2	C	4	2541
AC2C5	1	C	2	C	5	340
AC2C6	1	C	2	C	6	850
AC2D1	1	C	2	D	1	1455
AC2D2	1	C	2	D	2	4408
AC2D3	1	C	2	D	3	3071
AC2D4	1	C	2	D	4	965
AC3B1	1	C	3	B	1	4664
AC3D1	1	C	3	D	1	233
AC4C1	1	C	4	C	1	9060
AT1C1	1	T	1	C	1	6300
AT1C2	1	T	1	C	2	1320
AT2D1	1	T	2	D	1	4868
AT3D1	1	T	3	D	1	6920
AT4C1	1	T	4	C	1	1703
AT4C2	1	T	4	C	2	470
AT4C3	1	T	4	C	3	668
AT4C4	1	T	4	C	4	1552
AT4C5	1	T	4	C	5	950
AT5A1	1	T	5	A	1	568
AT5B1	1	T	5	B	1	603
AT5B2	1	T	5	B	2	1368
AT5B3	1	T	5	B	3	308
AT5C1	1	T	5	C	1	5237
AT5C2	1	T	5	C	2	1632
AT6A1	1	T	6	A	1	500
AT6C1	1	T	6	C	1	3186
AT6C2	1	T	6	C	2	710
AT7C1	1	T	7	C	1	1224
AT7C2	1	T	7	C	2	1242
AT7C3	1	T	7	C	3	2011
AT8A1	1	T	8	A	1	680
BC1B1	3	C	1	B	1	921
BC1D1	3	C	1	D	1	2882
BC2C1	3	C	2	C	1	2377
BC2C2	3	C	2	C	2	2751
BC3A1	3	C	3	A	1	3925
BC3B1	3	C	3	B	1	1114

BC4A1	3	C	4	A	1	1432
BC4A2	3	C	4	A	2	1259
BC4A3	3	C	4	A	3	1265
BC5B1	3	C	5	B	1	1605
BC5D1	3	C	5	D	1	3092
BC6B1	3	C	6	B	1	524
BC6B2	3	C	6	B	2	1625
BC7B1	3	C	7	B	1	589
BC8C1	3	C	8	C	1	2801
BC8E1	3	C	8	E	1	2835
BT1A1	3	T	1	A	1	759
BT1A2	3	T	1	A	2	4737
BT1B1	3	T	1	B	1	924
BT1B2	3	T	1	B	2	1699
BT1C1	3	T	1	C	1	2849
BT4B1	3	T	4	B	1	360
BT4C1	3	T	4	C	1	1562
BT4D1	3	T	4	D	1	3120
BT4D2	3	T	4	D	2	1276
BT5C1	3	T	5	C	1	3334
BT5C2	3	T	5	C	2	2942
BT5C3	3	T	5	C	3	2913
CC1D1	7	C	1	D	1	3965
CC2A1	7	C	2	A	1	1862
CC2C1	7	C	2	C	1	152
CC2C2	7	C	2	C	2	1950
CC2C3	7	C	2	C	3	606
CC3C1	7	C	3	C	1	3762
CC3C2	7	C	3	C	2	2696
CC4A1	7	C	4	A	1	1033
CC4B1	7	C	4	B	1	3508
CC5D1	7	C	5	D	1	2422
CC6B1	7	C	6	B	1	2571
CC7D1	7	C	7	D	1	1572
CC8B1	7	C	8	B	1	1263
CC8C1	7	C	8	C	1	1065
CC8D1	7	C	8	D	1	1543
CT3B1	7	T	3	B	1	1446
CT3C1	7	T	3	C	1	892
CT4B1	7	T	4	B	1	1315
CT4C1	7	T	4	C	1	1661
CT4C2	7	T	4	C	2	2008
CT4C3	7	T	4	C	3	2038
CT4C4	7	T	4	C	4	1227
CT4C5	7	T	4	C	5	1977
CT4D1	7	T	4	D	1	1513
CT5D1	7	T	5	D	1	1502
CT5D2	7	T	5	D	2	1853
CT7A1	7	T	7	A	1	458
CT7A2	7	T	7	A	2	710

CT7A3	7	T	7	A	3	631
DC1A1	9	C	1	A	1	1586
DC1C1	9	C	1	C	1	2928
DC1C2	9	C	1	C	2	8400
DC3A1	9	C	3	A	1	5297
DC3B1	9	C	3	C	1	3178
DC3C2	9	C	3	C	2	3122
DC4C1	9	C	4	C	1	3104
DC5C1	9	C	5	C	1	5941
DC6B1	9	C	6	B	1	3006
DC6C1	9	C	6	C	1	3295
DC6D1	9	C	6	D	1	2954
DC7D1	9	C	7	D	1	905
DC7D2	9	C	7	D	2	664
DC8C1	9	C	8	C	1	1215
DC8C2	9	C	8	C	2	965
DC8D1	9	C	8	D	1	7070
DT1B1	9	T	1	B	1	1855
DT2C1	9	T	2	C	1	2981
DT2C2	9	T	2	C	2	3411
DT2D1	9	T	2	D	1	3769
DT4D1	9	T	4	D	1	512
DT4D2	9	T	4	D	2	3993
DT6A1	9	T	6	A	1	484
DT7C1	9	T	7	C	1	4211
DT7D1	9	T	7	D	1	3980
DT7D2	9	T	7	D	2	1002
DT7D3	9	T	7	D	3	525
DT7D4	9	T	7	D	4	560
DT7D5	9	T	7	D	5	1008
DT7D6	9	T	7	D	6	288
DT7D7	9	T	7	D	7	2186
DT8C1	9	T	8	C	1	3199
DT8C2	9	T	8	C	2	1149
EC1B1	15	C	1	B	1	493
EC2A1	15	C	2	A	1	319
EC2A2	15	C	2	A	2	1160
EC2C1	15	C	2	C	1	1588
EC2C2	15	C	2	C	2	4172
EC2D1	15	C	2	D	1	5107
EC3C1	15	C	3	C	1	3366
EC4C1	15	C	4	C	1	1855
EC4C2	15	C	4	C	2	857
EC4C3	15	C	4	C	3	1211
EC4C4	15	C	4	C	4	729
EC4D1	15	C	4	D	1	3640
EC5A1	15	C	5	A	1	2386
EC5C1	15	C	5	C	1	3671
EC5C2	15	C	5	C	2	4986
EC5C3	15	C	5	C	3	2373

EC5D1	15	C	5	D	1	608
EC6A1	15	C	6	A	1	876
EC6C1	15	C	6	C	1	4300
EC7D1	15	C	7	D	1	2195
EC7D2	15	C	7	D	2	3188
EC8A1	15	C	8	A	1	8950
EC8C1	15	C	8	C	1	1450
EC8D1	15	C	8	D	1	1690
ET2C1	15	T	2	C	1	1578
ET2D1	15	T	2	D	1	2562
ET2D2	15	T	2	D	2	1207
ET3D1	15	T	3	D	1	5182
ET3D2	15	T	3	D	2	3827
ET3D3	15	T	3	D	3	1076
ET3D4	15	T	3	D	4	1104
ET5C1	15	T	5	C	1	658
ET5C2	15	T	5	C	2	3262
ET6D1	15	T	6	D	1	3567
ET7B1	15	T	7	B	1	608
ET7C1	15	T	7	C	1	1392
ET7C2	15	T	7	C	2	423
ET8B1	15	T	8	B	1	72
ET8C1	15	T	8	C	1	99
ET8C2	15	T	8	C	2	1863
ET8C3	15	T	8	C	3	7199
ET8D1	15	T	8	D	1	3369
FC2D1	30	C	2	D	1	1758
FC2D2	30	C	2	D	2	202
FC3D1	30	C	3	D	1	3583
FC4A1	30	C	4	A	1	398
FC4B1	30	C	4	B	1	2249
FC4B2	30	C	4	B	2	543
FC4B3	30	C	4	B	3	886
FC4B3	30	C	4	B	3	886
FC5B1	30	C	5	B	1	1774
FC5B2	30	C	5	B	2	1238
FC5C1	30	C	5	C	1	2001
FC6B1	30	C	6	B	1	1655
FC6B2	30	C	6	B	2	2256
FC7C1	30	C	7	C	1	3375
FC7C2	30	C	7	C	2	2394
FC8A1	30	C	8	A	1	2328
FC8A2	30	C	8	A	2	728
FC8A3	30	C	8	A	3	64
FC8B1	30	C	8	B	1	1605
FC8D1	30	C	8	D	1	876
FC8D2	30	C	8	D	2	590
FC8D3	30	C	8	D	3	854
FC8D4	30	C	8	D	4	4519
FC8D5	30	C	8	D	5	1082

FT1C1	30	T	1	C	1	6156
FT1C2	30	T	1	C	2	812
FT2A1	30	T	2	A	1	1065
FT2B1	30	T	2	B	1	2015
FT2C1	30	T	2	C	1	1594
FT3A1	30	T	3	A	1	1361
FT3A2	30	T	3	A	2	1160
FT3A3	30	T	3	A	3	1809
FT3A4	30	T	3	A	4	1833
FT3A5	30	T	3	A	5	760
FT4C1	30	T	4	C	1	2868
FT4D1	30	T	4	D	1	6430
FT5A1	30	T	5	A	1	1098
FT5C1	30	T	5	C	1	2904
FT5C2	30	T	5	C	2	608
FT5C3	30	T	5	C	3	2808
FT5D1	30	T	5	D	1	604
FT5D2	30	T	5	D	2	3261
FT5D3	30	T	5	D	3	293
FT6A1	30	T	6	A	1	2454
FT6A2	30	T	6	A	2	2160
FT6A3	30	T	6	A	3	1693
FT7C1	30	T	7	C	1	7636
FT7C2	30	T	7	C	2	619
FT7C3	30	T	7	C	3	7614
FT8C1	30	T	8	C	1	1545
FT8C2	30	T	8	C	2	2362
FT8C3	30	T	8	C	3	647
FT8C4	30	T	8	C	4	1693
FT8C5	30	T	8	C	5	2804
FT8C6	30	T	8	C	6	2147
FT8C7	30	T	8	C	7	2608
GC1A1	60	C	1	A	1	1935
GC1A2	60	C	1	A	2	1697
GC1A3	60	C	1	A	3	224
GC1A4	60	C	1	A	4	174
GC1A5	60	C	1	A	5	307
GC1B1	60	C	1	B	1	235
GC1B2	60	C	1	B	2	523
GC1B3	60	C	1	B	3	209
GC1B4	60	C	1	B	4	1747
GC1B5	60	C	1	B	5	907
GC1B6	60	C	1	B	6	1681
GC1B7	60	C	1	B	7	3723
GC1B8	60	C	1	B	8	3137
GC1B9	60	C	1	B	9	513
GC1C1	60	C	1	C	1	4224
GC1C2	60	C	1	C	2	79
GC1D1	60	C	1	D	1	620
GC2A1	60	C	2	A	1	367

GC2A2	60	C	2	A	2	3360
GC2A3	60	C	2	A	3	1424
GC2A4	60	C	2	A	4	988
GC2B1	60	C	2	B	1	7000
GC2B2	60	C	2	B	2	1950
GC2C1	60	C	2	C	1	6081
GC2C2	60	C	2	C	2	936
GC2C3	60	C	2	C	3	1279
GC2D1	60	C	2	D	1	3294
GC2D2	60	C	2	D	2	1058
GC2D3	60	C	2	D	3	4328
GC3A1	60	C	3	A	1	215
GC3A2	60	C	3	A	2	310
GC3a3	60	C	3	A	3	468
GC3A4	60	C	3	A	4	2321
GC3B1	60	C	3	B	1	1111
GC3B2	60	C	3	B	2	833
GC3B3	60	C	3	B	3	1519
GC3B4	60	C	3	B	4	152
GC3C1	60	C	3	C	1	2302
GC3C2	60	C	3	C	2	745
GC3C3	60	C	3	C	3	3185
GC3D1	60	C	3	D	1	235
GC3D2	60	C	3	D	2	924
GC4A1	60	C	4	A	1	8223
GC4B1	60	C	4	B	1	511
GC4B2	60	C	4	B	2	2600
GC4B3	60	C	4	B	3	786
GC4B4	60	C	4	B	4	2917
GC4C1	60	C	4	C	1	4235
GC4D1	60	C	4	D	1	4656
GC4D2	60	C	4	D	2	1218
GC4D3	60	C	4	D	3	487
GC5A1	60	C	5	A	1	768
GC5A2	60	C	5	A	2	7220
GC5A3	60	C	5	A	3	2568
GC5A4	60	C	5	A	4	2048
GC5A5	60	C	5	A	5	110
GC5B1	60	C	5	B	1	2155
GC5B2	60	C	5	B	2	770
GC5C1	60	C	5	C	1	4157
GC5C2	60	C	5	C	2	1382
GC5C3	60	C	5	C	3	6299
GC5C4	60	C	5	C	4	5797
GC5C6	60	C	5	C	6	319
GC5D1	60	C	5	D	1	1274
GC7A1	60	C	7	A	1	6690
GC7A2	60	C	7	A	2	1891
GC7A3	60	C	7	A	3	273
GC7B1	60	C	7	B	1	193

GC7B2	60	C	7	B	2	1380
GC7B3	60	C	7	B	3	2862
GC7B4	60	C	7	B	4	9090
GC7B5	60	C	7	B	5	2495
GC7C5	60	C	7	C	5	775
GC8A1	60	C	8	A	1	6324
GC8A2	60	C	8	A	2	1663
GC8A3	60	C	8	A	3	1214
GC8A4	60	C	8	A	4	4890
GC8B1	60	C	8	B	1	5827
GC8C1	60	C	8	C	1	2099
GC8C2	60	C	8	C	2	4409
GC8C3	60	C	8	C	3	1074
GC8C4	60	C	8	C	4	2129
GC8C5	60	C	8	C	5	1690
GT1A1	60	T	1	A	1	1980
GT1A2	60	T	1	A	2	224
GT1A3	60	T	1	A	3	351
GT1A4	60	T	1	A	4	6422
GT1A5	60	T	1	A	5	2451
GT1B1	60	T	1	B	1	829
GT1B2	60	T	1	B	2	696
GT1B3	60	T	1	B	3	3878
GT1C1	60	T	1	C	1	315
GT1C2	60	T	1	C	2	3676
GT1D1	60	T	1	D	1	829
GT1D2	60	T	1	D	2	1018
GT1D3	60	T	1	D	3	1009
GT1D4	60	T	1	D	4	2959
GT1D5	60	T	1	D	5	558
GT1D6	60	T	1	D	6	150
GT2A1	60	T	2	A	1	955
GT2A2	60	T	2	A	2	3657
GT2A3	60	T	2	A	3	595
GT2B1	60	T	2	B	1	6726
GT2B2	60	T	2	B	2	2399
GT2B3	60	T	2	B	3	2290
GT2B4	60	T	2	B	4	3767
GT2C1	60	T	2	C	1	1324
GT2C2	60	T	2	C	2	5251
GT3B1	60	T	3	B	1	2135
GT3C1	60	T	3	C	1	4380
GT4A1	60	T	4	A	1	2282
GT4A2	60	T	4	A	2	5370
GT4A3	60	T	4	A	3	3760
GT4A4	60	T	4	A	4	9461
GT4B1	60	T	4	B	1	360
GT4B2	60	T	4	B	2	2130
GT4B3	60	T	4	B	3	421
GT4B4	60	T	4	B	4	157

GT4B5	60	T	4	B	5	3766
GT4B6	60	T	4	B	6	8292
GT4B7	60	T	4	B	7	1368
GT4B8	60	T	4	B	8	1350
GT4C1	60	T	4	C	1	2350
HC111	90	C	1	1	1	890
HC112	90	C	1	1	2	1080
HC131	90	C	1	3	1	1635
HC132	90	C	1	3	2	1614
HC1D1	90	C	1	D	1	4300
HC1D2	90	C	1	D	2	6300
HC2A1	90	C	2	A	1	1158
HC2A2	90	C	2	A	2	2750
HC2A3	90	C	2	A	3	160
HC2A4	90	C	2	A	4	58
HC2B1	90	C	2	B	1	8094
HC2B2	90	C	2	B	2	330
HC2B3	90	C	2	B	3	2440
HC2B4	90	C	2	B	4	1665
HC2B5	90	C	2	B	5	760
HC311	90	C	3	1	1	5119
HC331	90	C	2	3	1	4771
HC332	90	C	3	3	2	2000
HC3B1	90	C	3	B	1	2385
HC4A1	90	C	4	A	1	378
HC4C1	90	C	4	C	1	4642
HC4C2	90	C	4	C	2	554
HC4C3	90	C	4	C	3	3616
HC4D1	90	C	4	D	1	3781
HC4D2	90	C	4	D	2	1633
HC611	90	C	6	1	1	6445
HC612	90	C	6	1	2	1632
HC621	90	C	6	2	1	10560
HC622	90	C	6	2	2	3037
HC623	90	C	6	2	3	6600
HC7A1	90	C	7	A	1	153
HC7A2	90	C	7	A	2	3960
HC7A3	90	C	7	A	3	439
HC7A4	90	C	7	A	4	5425
HC7A5	90	C	7	A	5	1297
HC7A6	90	C	7	A	6	1137
HC7B1	90	C	7	B	1	389
HC7B2	90	C	7	B	2	708
HC7B3	90	C	7	B	3	5325
HC7C1	90	C	7	C	1	1860
HC7D1	90	C	7	D	1	4064
HC811	90	C	8	1	1	3900
HC812	90	C	8	1	2	876
HC813	90	C	8	1	3	5817
HC8B1	90	C	8	B	1	5778

HC8D1	90	C	8	D	1	9694
HT111	90	T	1	1	1	1374
HT112	90	T	1	1	2	560
HT113	90	T	1	1	3	156
HT114	90	T	1	1	4	1113
HT1A1	90	T	1	A	1	3028
HT1A2	90	T	1	A	2	4789
HT1B1	90	T	1	B	1	2925
HT1B2	90	T	1	B	2	11304
HT1B3	90	T	1	B	3	5887
HT1C1	90	T	1	C	1	8849
HT1C2	90	T	1	C	2	4313
HT1C3	90	T	1	C	3	2800
HT1D1	90	T	1	D	1	2601
HT222	90	T	2	2	2	3220
HT231	90	T	2	3	1	10180
HT232	90	T	2	3	2	8000
HT233	90	T	2	3	3	7525
HT2C1	90	T	2	C	1	5053
HT2C2	90	T	2	C	2	5499
HT311	90	T	3	1	1	4460
HT312	90	T	3	1	2	3600
HT321	90	T	3	2	1	3579
HT322	90	T	3	2	2	10570
HT3C1	90	T	3	C	1	4270
HT3C2	90	T	3	C	2	1122
HT411	90	T	4	1	1	9843
HT412	90	T	4	1	2	3255
HT4B1	90	T	4	B	1	2628
HT4B2	90	T	4	B	2	7577
HT4B3	90	T	4	B	3	4680
HT4C1	90	T	4	C	1	5548
HT4C2	90	T	4	C	2	2979
HT5A1	90	T	5	A	1	4063
HT5A2	90	T	5	A	2	1224
HT5A3	90	T	5	A	3	3570
HT5A4	90	T	5	A	4	8516
HT5A5	90	T	5	A	5	10100
HT5B1	90	T	5	B	1	5515
HT5B2	90	T	5	B	2	10482
HT5B3	90	T	5	B	3	4708
HT5B4	90	T	5	B	4	9588
HT5D1	90	T	5	D	1	5041
HT5D2	90	T	5	D	2	2150
HT611	90	T	6	1	1	2234
HT641	90	T	6	4	1	4513
HT642	90	T	6	4	2	898
HT6B1	90	T	6	B	1	2048
HT6B2	90	T	6	B	2	2113
HT6B3	90	T	6	B	3	192

HT6B5	90	T	6	B	5	1168
HT6C1	90	T	6	C	1	5169
HT7A1	90	T	7	A	1	6511
HT7B1	90	T	7	B	1	827
HT7B2	90	T	7	B	2	4195
HT7B3	90	T	7	B	3	4506
HT7B4	90	T	7	B	4	718
HT7B5	90	T	7	B	5	1055
HT7B6	90	T	7	B	6	602
HT7C1	90	T	7	C	1	4120
HT7C2	90	T	7	C	2	1976
HT7D1	90	T	7	D	1	5470
HT8B1	90	T	8	B	1	3582
HT8B2	90	T	8	B	2	1708
HT8B3	90	T	8	B	3	3525
HT8B4	90	T	8	B	4	3765
HT8C1	90	T	8	C	1	4442
HT8D1	90	T	8	D	1	3050
JC1B1	180	C	1	B	1	3698
JC1B2	180	C	1	B	2	3739
JC1B3	180	C	1	B	3	2004
JC1B4	180	C	1	B	4	1878
JC1B5	180	C	1	B	5	5222
JC1B6	180	C	1	B	6	1690
JC1C1	180	C	1	C	1	5805
JC1C2	180	C	1	C	2	566
JC1C3	180	C	1	C	3	3774
JC1C4	180	C	1	C	4	3518
JC1D1	180	C	1	D	1	8101
JC2A1	180	C	2	A	1	4055
JC2A2	180	C	2	A	2	5765
JC2C1	180	C	2	C	1	4130
JC3A1	180	C	3	A	1	7217
JC3B1	180	C	3	B	1	502
JC4B1	180	C	4	B	1	4261
JC4B2	180	C	4	B	2	4887
JC4B3	180	C	4	B	3	9562
JC6A1	180	C	6	A	1	8829
JC6A2	180	C	6	A	2	1572
JC6D1	180	C	6	D	1	4067
JC6D2	180	C	6	D	2	5712
JC6D3	180	C	6	D	3	6533
JC7A1	180	C	7	A	1	5318
JC7B1	180	C	7	B	1	982
JC7B2	180	C	7	B	2	9271
JC7B3	180	C	7	B	3	150
JC7C1	180	C	7	C	1	5674
JC7C2	180	C	7	C	2	3480
JC7C3	180	C	7	C	3	4741
JC7D1	180	C	7	D	1	89

JC7D2	180	C	7	D	2	103
JC7D3	180	C	7	D	3	442
JC7D4	180	C	7	D	4	1155
JC8A1	180	C	8	A	1	11076
JC8B1	180	C	8	B	1	245
JC8B2	180	C	8	B	2	1234
JC8B3	180	C	8	B	3	8507
JC8C1	180	C	8	C	1	7350
JT1A1	180	T	1	A	1	2648
JT1A2	180	T	1	A	2	422
JT1A3	180	T	1	A	3	3111
JT1A4	180	T	1	A	4	12815
JT1B1	180	T	1	B	1	4556
JT1B2	180	T	1	B	2	3727
JT1B3	180	T	1	B	3	6600
JT1B4	180	T	1	B	4	4180
JT1C1	180	T	1	C	1	1768
JT1C2	180	T	1	C	2	192
JT1C3	180	T	1	C	3	1744
JT1D1	180	T	1	D	1	10730
JT2A1	180	T	2	A	1	1534
JT2B1	180	T	2	B	1	3332
JT2B2	180	T	2	B	2	1238
JT2B3	180	T	2	B	3	85
JT2B4	180	T	2	B	4	4430
JT2B5	180	T	2	B	5	314
JT2B6	180	T	2	B	6	322
JT2B7	180	T	2	B	7	94
JT2B8	180	T	2	B	8	15
JT2D1	180	T	2	D	1	2432
JT2D2	180	T	2	D	2	890
JT2D3	180	T	2	D	3	2325
JT3A1	180	T	3	A	1	8130
JT3A2	180	T	3	A	2	5090
JT3A3	180	T	3	A	3	1760
JT3A4	180	T	3	A	4	814
JT3B1	180	T	3	B	1	8238
JT3B2	180	T	3	B	2	2030
JT3C1	180	T	3	C	1	1693
JT3C2	180	T	3	C	2	670
JT3C3	180	T	3	C	3	2770
JT3D1	180	T	3	D	1	2311
JT3D2	180	T	3	D	2	2890
JT3D3	180	T	3	D	3	913
JT4A1	180	T	4	A	1	4096
JT4A2	180	T	4	A	2	3394
JT4A3	180	T	4	A	3	5725
JT4A4	180	T	4	A	4	2890
JT4A5	180	T	4	A	5	6657
JT4A6	180	T	4	A	6	208

JT4B1	180	T	4	B	1	490
JT4B2	180	T	4	B	2	677
JT4B3	180	T	4	B	3	3480
JT4B4	180	T	4	B	4	6235
JT4C1	180	T	4	C	1	9428
JT4C2	180	T	4	C	2	5803
JT4C3	180	T	4	C	3	190
JT4C4	180	T	4	C	4	307
JT4D1	180	T	4	D	1	2704
JT4D2	180	T	4	D	2	1847
JT4D3	180	T	4	D	3	304
JT5A1	180	T	5	A	1	1000
JT5B1	180	T	5	B	1	4859
JT5B2	180	T	5	B	2	1967
JT5B3	180	T	5	B	3	495
JT5B4	180	T	5	B	4	325
JT5B5	180	T	5	B	5	7578
JT6A1	180	T	6	A	1	8383
JT6A2	180	T	6	A	2	1253
JT6A3	180	T	6	A	3	959
JT6A4	180	T	6	A	4	1554
JT6A5	180	T	6	A	5	1026
JT6A6	180	T	6	A	6	367
JT6B1	180	T	6	B	1	4339
JT6C1	180	T	6	C	1	2463
JT6D1	180	T	6	D	1	4700
JT7A3	180	T	7	A	3	4792
JT7B1	180	T	7	B	1	2400
JT7B2	180	T	7	B	2	2460
JT8A1	180	T	8	A	1	1594
JT8A2	180	T	8	A	2	3225
JT8A3	180	T	8	A	3	4890
JT8A4	180	T	8	A	4	6800
JT8B1	180	T	8	B	1	4081
JT8B2	180	T	8	B	2	10414
JT8B3	180	T	8	B	3	7740
JT8C1	180	T	8	C	1	1833
JT8C2	180	T	8	C	2	4034
KC1C1	120	C	1	C	1	894
KC1C2	120	C	1	C	2	11834
KC1C3	120	C	1	C	3	5439
KC1D1	120	C	1	D	1	503
KC1E1	120	C	1	E	1	5404
KC1F1	120	C	1	F	1	4490
KC2A1	120	C	2	A	1	425
KC2A2	120	C	2	A	2	2293
KC2B1	120	C	2	B	1	1079
KC2B2	120	C	2	B	2	8266
KC2B3	120	C	2	B	3	701
KC2E1	120	C	2	E	1	3560

KC2E2	120	C	2	E	2	3094
KC2E3	120	C	2	E	3	1633
KC3A1	120	C	3	A	1	7669
KC3A2	120	C	3	A	2	903
KC3A3	120	C	3	A	3	6982
KC3A4	120	C	3	A	4	4483
KC3C1	120	C	3	C	1	4685
KC3C2	120	C	3	C	2	4630
KC4A1	120	C	4	A	1	6119
KC4A2	120	C	4	A	2	4320
KC4A3	120	C	4	A	3	5481
KC4A4	120	C	4	A	4	3558
KC4A5	120	C	4	A	5	1247
KC4C1	120	C	4	C	1	3297
KC6A1	120	C	6	A	1	3898
KC6A2	120	C	6	A	2	8807
KC6E1	120	C	6	E	1	2467
KC6E2	120	C	6	E	2	2225
KC6E3	120	C	6	E	3	2317
KC8A1	120	C	8	A	1	909
KC8A2	120	C	8	A	2	1663
KC8B1	120	C	8	B	1	6831
KC8D1	120	C	8	D	1	1830
KT2C1	120	T	2	C	1	1637
KT2C2	120	T	2	C	2	739
KT3T1	120	T	3	T	1	1209
KT3T2	120	T	3	T	2	1973
KT3T3	120	T	3	T	3	3035
KT4A1	120	T	4	A	1	496
KT4A2	120	T	4	A	2	2956
KT4A3	120	T	4	A	3	7881
KT4A4	120	T	4	A	4	2301
KT4C1	120	T	4	C	1	2692
KT4D2	120	T	4	D	2	5708
KT5C1	120	T	5	C	1	1032
KT6A1	120	T	6	A	1	970
KT6A2	120	T	6	A	2	1165
KT6B1	120	T	6	B	1	4785
KT6B2	120	T	6	B	2	3036
KT6C1	120	T	6	C	1	843
KT6C2	120	T	6	C	2	4442
KT6D1	120	T	6	D	1	12260
KT7C1	120	T	7	C	1	7891
KT7D1	120	T	7	D	1	1302
KT8A1	120	T	8	A	1	2374
KT8A2	120	T	8	A	2	6933
KT8C1	120	T	8	C	1	563
KT8C2	120	T	8	C	2	2563
KT8C3	120	T	8	C	3	3508
KT9A1	120	T	9	A	1	1034

KT9C1	120	T	9	C	1	1808
KT9C2	120	T	9	C	2	7049
KT9C3	120	T	9	C	3	3172
KT9C4	120	T	9	C	4	2795
KT9D1	120	T	9	D	1	2558
KT9D2	120	T	9	D	2	3534
KT9D3	120	T	9	D	3	965
KT9D4	120	T	9	D	4	2521
KT9D5	120	T	9	D	5	465
KT9D6	120	T	9	D	6	7844
LC1A1	270	C	1	A	1	2012
LC1A2	270	C	1	A	2	1800
LC1A3	270	C	1	A	3	2240
LC1B1	270	C	1	B	1	1492
LC1B2	270	C	1	B	2	544
LC1B3	270	C	1	B	3	2728
LC1B4	270	C	1	B	4	2355
LC3B1	270	C	3	B	1	6171
LC3B2	270	C	3	B	2	3799
LC3B3	270	C	3	B	3	53
LC3B4	270	C	3	B	4	2155
LC3B5	270	C	3	B	5	2531
LC3C1	270	C	3	C	1	1731
LC3D1	270	C	3	D	1	5501
LC3D2	270	C	3	D	2	3890
LC3D3	270	C	3	D	3	1840
LC3D4	270	C	3	D	4	807
LC4B1	270	C	4	B	1	4076
LC4B2	270	C	4	B	2	981
LC4C1	270	C	4	C	1	4764
LC4D1	270	C	4	D	1	1085
LC4D2	270	C	4	D	2	224
LC5A1	270	C	5	A	1	2539
LC5D1	270	C	5	D	1	1664
LC5D2	270	C	5	D	2	1956
LC6B1	270	C	6	B	1	139
LC7B1	270	C	7	B	1	351
LC7B2	270	C	7	B	2	162
LC7C1	270	C	7	C	1	1306
LC7D1	270	C	7	D	1	2900
LC8A1	270	C	8	A	1	1223
LC8A2	270	C	8	A	2	2383
LC8A3	270	C	8	A	3	583
LC8B1	270	C	8	B	1	2628
LC8B2	270	C	8	B	2	1164
LC8C2	270	C	8	C	2	3311
LT2A1	270	T	2	A	1	3518
LT2A2	270	T	2	A	2	4125
LT2B1	270	T	2	B	1	2781
LT2B2	270	T	2	B	2	108

LT2C1	270	T	2	C	1	2644
LT2C2	270	T	2	C	2	1327
LT4C1	270	T	4	C	1	1964
LT4C2	270	T	4	C	2	2314
LT5A1	270	T	5	A	1	1513
LT5A2	270	T	5	A	2	4551
LT5B1	270	T	5	B	1	845
LT5C1	270	T	5	C	1	1116
LT8A1	270	T	8	A	1	1087
LT8A2	270	T	8	A	2	3792
LT8A3	270	T	8	A	3	1835
LT8A4	270	T	8	A	4	1715
LT8A5	270	T	8	A	5	917
LT8B1	270	T	8	B	1	2575
LT8D1	270	T	8	D	1	1338
LT8D2	270	T	8	D	2	2708
LTZB1	270	T	2	B	1	1434
MC1A1	365	C	1	A	1	1367
MC2B1	365	C	2	B	1	959
MC2D1	365	C	2	D	1	1383
MC2D1	365	C	2	D	1	1383
MC2D2	365	C	2	D	2	1814
MC2D3	365	C	2	D	3	1997
MC2D4	365	C	2	D	4	1863
MC3A1	365	C	3	A	1	2337
MC3B1	365	C	3	B	1	2927
MC3B2	365	C	3	B	2	1033
MC3B3	365	C	3	B	3	1079
MC3C1	365	C	3	C	1	3271
MC4C1	365	C	4	C	1	5404
MC4C2	365	C	4	C	2	2917
MC4C3	365	C	4	C	3	411
MC4C5	365	C	4	C	5	376
MC4C6	365	C	4	C	6	629
MC4D1	365	C	4	D	1	2083
MC7C1	365	C	7	C	1	5470
MC7C2	365	C	7	C	2	3108
MC7D1	365	C	7	D	1	5812
MC7D2	365	C	7	D	2	3214
MC8A2	365	C	8	A	2	52
MC8C1	365	C	8	C	1	1423
MC8C2	365	C	8	C	2	3265
MT2B1	365	T	2	B	1	5014
MT2B2	365	T	2	B	2	2411
MT2B3	365	T	2	B	3	2703
MT2C1	365	T	2	C	1	503
MT2C2	365	T	2	C	2	384
MT2C3	365	T	2	C	3	351
MT2C4	365	T	2	C	4	550
MT2C5	365	T	2	C	5	419

MT2C6	365	T	2	C	6	2152
MT3A1	365	T	3	A	1	2628
MT3D1	365	T	3	D	1	2540
MT5C1	365	T	5	C	1	4195
MT5C2	365	T	5	C	2	1393
MT5C3	365	T	5	C	3	2840
MT8C1	365	T	8	C	1	2433
MT8C2	365	T	8	C	2	1266