



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Paulo Estacia

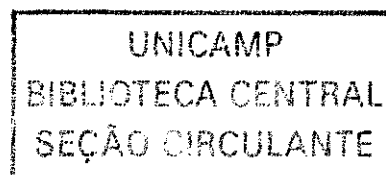
*Avaliação do efeito do Perfluorooctano e do Perfluorohexilooctano
sobre cultura de células Vero*

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Paulo Estacia
[assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa.Dra. Selma Candelária Genari

Co-Orientador: Prof.Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior



UNIDADE PC
 Nº CHAMADA T/UNICAMP
Es81a
 V _____ EX _____
 TOMBO BCI 57169
 PROC 16/127104
 C _____ D ✓
 PREÇO 11,00
 DATA 02/03/04
 Nº CPD _____

CM00195163-5

BIB ID 311249

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Es81a

Estacia, Paulo

Avaliação do efeito do Perfluorooctano e do Perfluorohexilooctano sobre cultura de células Vero / Paulo Estacia.--
Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientadora: Selma Candelária Genari

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1. Retina. 2. Cultura celular. 3. Celulas vero. I. Genari, Selma Candelária.
- II.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III.Título.

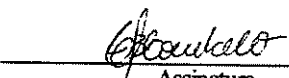
Campinas, 30 de setembro de 2003

BANCA EXAMINADORA

Profa.Dra. Selma Candelária Genari (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Christiane Bertachini Lombello


Assinatura

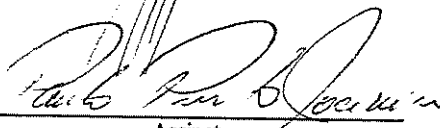
Prof.Dr. Mário Martins dos Santos Motta


Assinatura

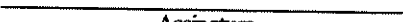
Prof.Dr. Nilo Holzchuh


Assinatura

Prof.Dr. Paulo Pinto Joazeiro


Assinatura

Profa.Dra. Mary Anne Heidi Dolder


Assinatura

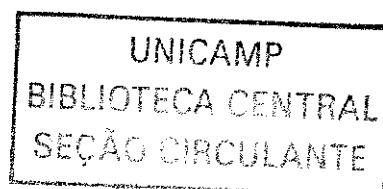
Prof.Dr. José Meciano Filho


Assinatura

DEDICATÓRIA:

Para *José e Linda*, meus pais, exemplo de perseverança.

Para *Cida*, minha esposa, por compartilhar do meu entusiasmo e me apoiar nas horas difíceis, para *Carolina e Carime*, minhas filhas, pela compreensão e paciência.



AGRADECIMENTOS:

A Profa. Dra. Selma Candelária Genari pela atenção e interesse oferecidos na orientação desta tese.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Junior, pela orientação, apoio e amizade que fizemos durante estes anos de convivência, meu sincero reconhecimento e muito obrigado.

A Profa. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada, primeira orientadora e incentivadora deste estudo.

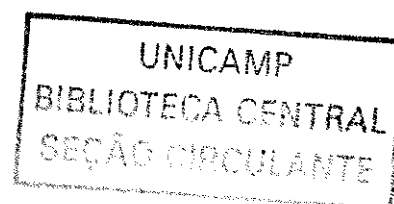
Aos membros da banca examinadora, pacientes e disponíveis, agradeço as sugestões e orientações para o aperfeiçoamento do trabalho.

A colega de pós-graduação Carmen Busin, agradeço o companheirismo.

A Patrícia da Luz Moreira pelo auxílio na bancada do laboratório.

Ao Dr. Sérgio Schneider, colega oftalmologista, pela colaboração na aquisição de algumas das substâncias usadas neste trabalho.

Aos funcionários do departamento de Biologia Celular, em especial a Liliam, pelo apoio na secretaria.



ABREVIACÕES UTILIZADAS

ASF - alceno semifluorinado

ASFs - alcanos semifluorinados

AT - azul de toluidina

BSA - albumina sérica bovina

BSS - solução salina balanceada

FCS – fetal calf serum

F₆H₈ - perfluorohexiloctano

MEV - microscopia eletrônica de varredura

PBS - tampão fosfato salino

PFCL - perfluorocarbono líquido

PFCLs - perfluorocarbonos líquidos

PFOC - perfluorooctano

SFB - soro fetal bovino

XP - xilidina ponceau

SEM - scanning electronic microscopy

ISO - International Standards Organization

ARTIGOS QUE COMPÕEM ESTA TESE

Estacia P., Santos Jr. A. R., Moreira P. L., Genari S., The cytotoxicity in Vero cells of perfluorocarbon used in vitreoretinal surgery. *Braz. J. Morphol. Sci.* **19**, 41-47, 2002 (CAPÍTULO I).

Estacia P., Santos Jr. A. R., Genari S., Assessment of the possible toxic effect of a semifluorinated alkane on Vero cell culture. (CAPÍTULO II) - submetido a *Current Eye Research*.

Estacia P., Santos Jr. A. R., Genari S., Avaliação do efeito do perfluorooctano e do perfluorohexilooctano utilizados em cirurgias oftalmológicas, sobre cultura de células Vero (CAPÍTULO III) - a ser submetido a *Graefes's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	v
ABREVIACÕES UTILIZADAS.....	vi
ARTIGOS QUE COMPÕEM ESTA TESE.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
I - INTRODUÇÃO.....	11
I.1 – Anatomia do olho.....	12
I.2 - Os perfluorocarbonos líquidos.....	14
I.3 - Toxicidade dos perfluorocarbonos.....	16
I.4 - Os alcanos semifluorinados.....	18
I.5 - Abordagem experimental.....	19
II - OBJETIVOS.....	21
III - ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	23
CAPÍTULO I.....	24
CAPÍTULO II.....	32
CAPÍTULO III.....	52
IV - CONCLUSÕES.....	81
V - BIBLIOGRAFIA.....	83

RESUMO

Os perfluorocarbonos líquidos (PFCLs) são usados em cirurgias oftalmológicas servindo não apenas como ferramenta intra-operatória, mas também como agente tamponante intra-ocular. Entretanto, alguns autores afirmam que o perfluorooctano (PFOC), um tipo de PFCLs, pode causar reações inflamatórias e danos celulares à retina. Na tentativa de solucionar esses inconvenientes, foram desenvolvidos os alcanos semifluorinados (ASF) com a indicação de substituto vítreo de longo prazo. Nesse sentido, avaliou-se o possível efeito tóxico apresentado pelo PFOC e pelo perfluorohexilooctano (F_6H_8), um tipo de ASF, em condições controladas por meio de cultura celular. Utilizou-se, para isso, a linhagem celular Vero, internacionalmente recomendada para ensaios com citotoxicidade e estudos com biomateriais. Foi feita uma análise da toxicidade indireta, onde as células entram em contato apenas com elementos solúveis que possam ser eliminados pelo PFOC ou F_6H_8 , e toxicidade direta, ou seja, a toxicidade dependente do contato, do PFOC ou F_6H_8 com as células. A toxicidade indireta foi realizada por métodos quantitativos através da absorbância, indicando a viabilidade celular. A toxicidade direta foi avaliada por meio de métodos citoquímicos, imunocitoquímicos e morfológicos, utilizando-se como controle células em meio de cultura livre de qualquer tratamento, um controle positivo para toxicidade (adesivos de silicone), que apresentam comprovado efeito tóxico, e um controle de peso (lâminulas de vidro) que exercessem uma compressão mecânica similar ao PFOC ou F_6H_8 utilizados. A análise da toxicidade, seja direta ou indireta, foi feita, inicialmente, para o PFOC e F_6H_8 individualmente e, depois, de forma conjunta e comparativa. Em relação ao PFOC, os estudos mostraram que não apresenta toxicidade indireta, mas é capaz de promover algumas alterações tóxicas mediadas pelo contato direto. O F_6H_8 também não mostrou toxicidade direta, ao contrário do PFOC; as alterações celulares promovidas pelo F_6H_8 eram similares às feitas pelo controle peso e distintas do controle de toxicidade. Assim, concluiu-se que o F_6H_8 não apresenta efeito tóxico direto, apenas compressivo. Esses dados foram corroborados pelo estudo integrado e comparativo, reforçando nossas conclusões. A análise conjunta dos dados mostrou que o F_6H_8 é um produto com melhores propriedades como substituto vítreo de longo prazo do que o PFOC, porque, ao contrário deste último, não apresentou efeito tóxico e, por ter um menor peso específico, gerou uma menor ação compressiva sobre as células estudadas.

ABSTRACT

Perfluorocarbon liquids (PFCLs) are used in eye surgeries, not only as an intraoperative tool, but also as intraocular tamponading agents. However, some authors state that perfluorooctane (PFOC), a type of PFCL, may cause inflammatory reactions and damage the retina. In an attempt to avoid these effects, semifluorinated alkanes (SFA) were developed as long-term vitreous replacements. Therefore, we comparatively assessed the potential toxic effect of PFOC and perfluorohexyloctane (F_6H_8), a type of SFA, under controlled cell culture conditions. Vero cells were used for this purpose, as internationally recommended for cytotoxicity tests and studies with biomaterials. We analyzed indirect cytotoxicity, where the cells only come into contact with soluble elements that can be eliminated by PFOC and F_6H_8 , in addition to direct toxicity (contact toxicity) of PFOC or F_6H_8 to the cells. Indirect toxicity was assessed quantitatively by way of absorbance, indicating cell viability. In its turn, direct toxicity was evaluated by cytochemical, immunocytochemical and morphological methods. Cells embedded in a treatment-free culture medium were used as control – a positive control for toxicity (silicone bands), with an undeniably toxic effect on cells, and a weight control (glass slides) that produced a mechanical compression similar to the amount of PFOC or F_6H_8 used in the experiment. Both direct and indirect toxicity were first assessed separately and, later on, collectively and comparatively. Our results show that PFOC does not produce indirect toxicity, but it causes some toxic effects mediated by direct contact; and that F_6H_8 did not present direct toxicity. Differently from PFOC, cellular alterations caused by F_6H_8 were similar to those produced by the weight control and different from the toxicity control. Therefore, our conclusion is that F_6H_8 has a compressive rather than a direct toxic effect. These findings were corroborated by the integrated and comparative study, thus strengthening our conclusions. The joint analysis of our data revealed that F_6H_8 has better properties as long-term vitreous replacement than PFOC, since it showed a lower specific weight and no toxic effect, which resulted in a lighter compressive action on the cultured cells.

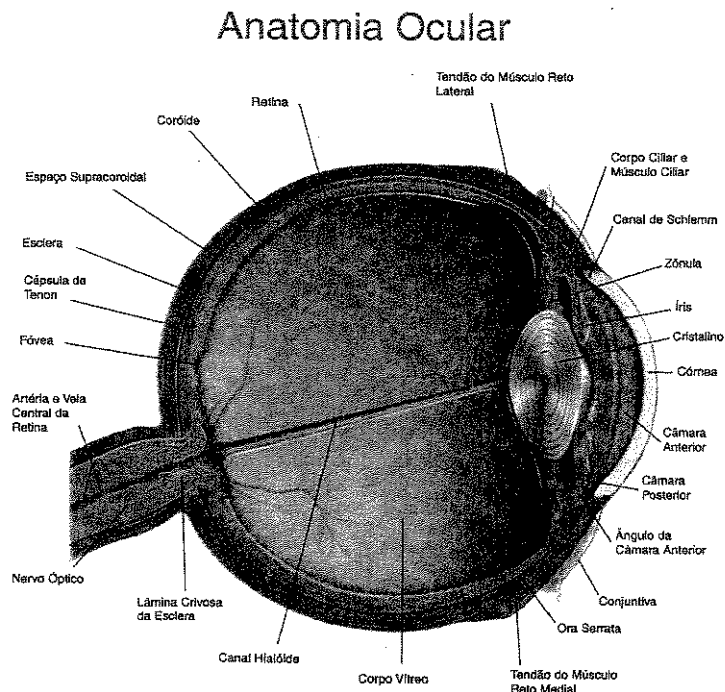
I - INTRODUÇÃO

Em oftalmologia, a cirurgia de vítreo e retina é considerada das mais complexas e, muitas vezes, com menos resultados positivos em relação à cura funcional e anatômica, quando comparada com cirurgias realizadas para resolver problemas de outras partes do olho.

O tratamento do descolamento de retina normalmente é cirúrgico e, quando realizado com as técnicas usuais de introflexão escleral, nem sempre é eficiente em manter a retina reaplicada no pós-operatório, pois, conforme o tamanho da ruptura, a extensão e o tempo do descolamento, ocorre um processo de proliferação fibrosa que tende a manter a retina descolada (Mathis *et. al.* 1992).

I.1 – Anatomia do olho

Na descrição da anatomia ocular (conforme figura abaixo), duas estruturas que participam da formação do globo ocular devem ser avaliadas com mais detalhe: a retina e a córnea. A primeira, por ser o local onde o perfluorooctano (PFOC) e o perfluorohexiloctano (F_6H_8) serão primariamente utilizados e a segunda, pela possibilidade de que estas substâncias entrem em contato com as células de sua face interna, em consequência de alterações da estrutura destes olhos operados.



Desenho esquemático da anatomia ocular

A retina é uma camada de células nervosas com localização mais interna no globo ocular; cobre os seus dois terços posteriores e é responsável pela transformação do estímulo luminoso em estímulo de natureza eletroquímica, com sua posterior transmissão para o cérebro, onde será interpretado. Está aderida a camadas adjacentes que proporcionam parte de sua nutrição.

Quando o tapete retiniano apresenta a formação de orifícios ou rupturas, que podem ser decorrentes de traumas, de processos degenerativos da própria retina ou por tração vítrea, esta pode acabar descolando pela infiltração do vítreo através do orifício ou ruptura, com perda subsequente da visão na área descolada, num processo normalmente irreversível e que leva à cegueira do olho afetado se nada for feito (Sigelman, 1984).

A córnea é a camada transparente do olho através da qual os estímulos luminosos penetram. Sua estrutura tem diferentes tipos celulares e, na sua parte mais interna, há o endotélio corneano, formado por uma monocamada de células que se caracterizam pela sua pequena capacidade de regeneração, basicamente devido à ausência de atividade mitótica ao longo da vida do indivíduo. (Leibowitz, 1984).

Essas células do endotélio corneano são fundamentais para manter a transparência da córnea; apresentam grande atividade metabólica, com um citoplasma rico em mitocôndrias grandes e complexo de Golgi bem desenvolvido (Grayson, 1983). Regulam o fluxo e a composição dos íons que penetram neste tecido, permitindo uma hidratação ótima e, em consequência, uma espessura e transparência constantes (Leibowitz, 1984). Uma diminuição no número dessas células que leve ao comprometimento da integridade dessa camada, o que pode ocorrer em várias condições, pode ocasionar uma descompensação da córnea, com alteração nos níveis de hidratação deste tecido, diminuição de sua transparência e consequente redução da visão. Isso, freqüentemente, torna necessária a realização de um transplante de córnea penetrante, que engloba todas as camadas da córnea, incluindo o endotélio (Acedo, 1992).

A diminuição das células endoteliais ocorre, entre outros fatores, pela idade, uso excessivo de lentes de contato, radiação ultravioleta, trauma, cirurgia intra-ocular, inflamação ou distrofias, que podem levar a um decréscimo na densidade celular, com alteração no seu padrão de distribuição, comprometendo a integridade funcional desta

monocamada celular (Hoppenreijns *et al.*, 1996). A incapacidade mitótica impede uma completa regeneração do endotélio corneano após cirurgias ou trauma. O processo de cicatrização acontece, então, por uma migração e alterações na morfologia das células restantes, que mudam sua forma (pleomorfismo) e tamanho (polimegatismo) para recobrir a área lesada (Hoppenreijns *et al.*, 1996). Durante a resposta das células do endotélio da córnea aos estados patológicos ou de sofrimento observa-se frequentemente, também presença de microvilosidades na superfície celular (Grayson, 1983).

Embora o olho normal seja compartimentado em segmento anterior e posterior pelo cristalino, muitas vezes a indicação de uso de um perfluorocarbono (PFCL) ou de um alcano semifluorinado (ASF), é feita em situações em que esta barreira não está mais presente, seja pela realização de cirurgia de catarata anteriormente, seja pela necessidade de retirada do cristalino durante a cirurgia de vítreo-retina no segmento posterior em que se fez uso de F_6H_8 , permitindo, assim, a migração deste para o segmento anterior e o conseqüente contato com o endotélio corneano (Queiroz Jr. *et al.*, 1992).

Na procura de soluções que permitissem devolver a retina ao seu leito natural de uma maneira mais eficiente e menos traumática nestes casos, foi introduzido, há alguns anos, na oftalmologia o uso de perfluorocarbonos líquidos. Essas substâncias, utilizadas na cirurgia vitreoretiniana, foram desenvolvidas, inicialmente, como substitutos artificiais do sangue, em 1966, e apresentam propriedades físicas que facilitam sua utilização em cirurgias oftalmológicas (Chang *et al.* 1989).

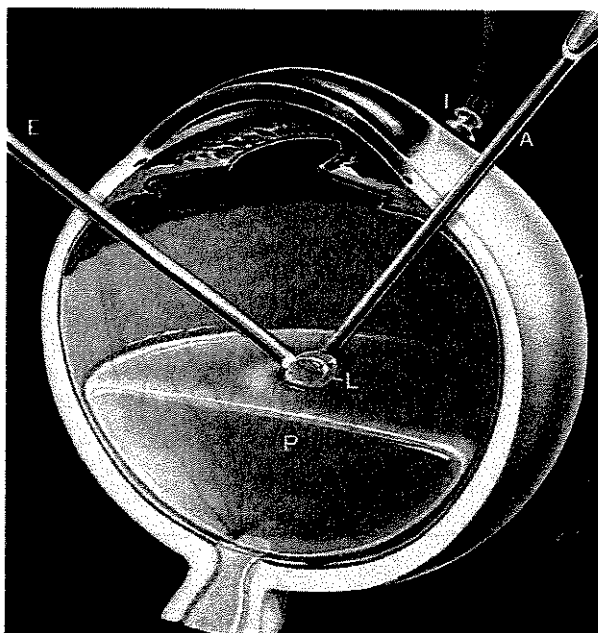
I.2 - Os Perfluorocarbonos líquidos

Os perfluorocarbonos líquidos (PFCLs), são compostos sintéticos com ligações fluor-carbono e que apresentam propriedades físicas similares entre si, como um alto peso específico (maior peso em relação ao mesmo volume de água) e imiscibilidade com a água e sangue (Peyman *et al.*, 1995). Apresentam, ainda, baixa viscosidade, o que facilita sua colocação e remoção com cânulas de microcirurgia no interior do olho durante o ato operatório, após a retirada do vítreo (Chang *et al.*, 1989); também não são alterados quando necessário tratamento com laser intra-ocular (Meinert *et al.*, 1995).

A utilização dos PFCLs facilita a cirurgia numa ampla variedade de condições, e seu uso foi introduzido a partir de 1987, inicialmente no manuseio dos casos complicados

de descolamento de retina (Chang S., 1987). Atualmente são usados também no manuseio de rupturas gigantes de retina (Mathis *et al.*, 1992) e casos graves de vitreorretinopatia diabética (Chang *et al.*, 1988; Coll *et al.*, 1995), com o intuito de reaplicar a retina e de mantê-la em sua posição anatômica, com maior facilidade e segurança (Glaser *et al.*, 1991). Isso é possível em razão da maior gravidade específica desses líquidos, que promovem uma estabilização hidrocínética da retina no pólo posterior do olho durante a cirurgia, deslocando o líquido sub-retiniano sem necessidade de outros procedimentos, como uma retinotomia posterior (Mertens *et al.*, 2000). Para isso, o ideal seria manter esses líquidos nos olhos durante um período de três a quatro meses após a cirurgia, para sedimentar o processo de aderência da retina ao seu leito original. Daí o interesse nestas substâncias, em relação a sua utilização como possível substituto vítreo de longo prazo, por ser mais eficiente em manter a retina colada, como demonstrado por Sparrow *et al.* (1992) em descolamentos de retina induzidos experimentalmente.

Os perfluorcarbonos também são utilizados como ferramenta transoperatória em outras situações, como para controle de hemorragias vítreas transoperatórias (Moreira Jr. *et al.*, 1997), para retirar o cristalino que luxou para a parte posterior do olho, lentes intra-oculares deslocadas e corpos estranhos (conforme a ilustração abaixo). Isso é possível pela flutuabilidade dessas estruturas, ou seja, sua densidade é menor que o PFCL, embora seu uso também seja descrito para a retirada de corpos estranhos mais densos, aproveitando-se a tensão de superfície que se forma na interface do PFCL com a solução salina utilizada na cirurgia (Sudhakar & Johnson, 1998).



Uso dos PFCLs para retirada do cristalino luxado na cavidade vítrea -
Highlights of Ophthalmology, reproduzido com permissão dos autores.

Entre os PFCLs utilizados em oftalmologia estão o perfluorooctano, o perfluorodecalin, a perfluorotributilamina, e o perfluorperhidrophenanthrene, todos com grande capacidade de transportar e de liberar tanto oxigênio (O_2) como dióxido de carbono (CO_2). O perfluorooctano é o PFCL mais utilizado atualmente em oftalmologia por permitir boa visão da interface entre ele e a solução salina balanceada (BSS) utilizada na cirurgia, sendo que sua presença e localização no olho podem ser vistas facilmente (Liang & Peyman, 1999). A eficiência em manter a retina aplicada em longo prazo não parece diferir muito entre os vários tipos de PFCLs e a decisão sobre qual perfluorocarbono utilizar vai se basear em uma série de considerações, como experiência do cirurgião, disponibilidade e custo (Loewenstein *et al.*, 2000). A elevada tensão superficial destas substâncias permite que a pressão exercida sobre a retina seja proporcionalmente alta, devido à formação de um ângulo de contato maior entre o PFCL e superfície interna do globo ocular (Wong & Lois, 2000).

O óleo de silicone é o substituto vítreo utilizado atualmente por períodos de tempo mais longos (um ano ou mais, ou mesmo permanentemente), mas com menor eficiência de tamponamento, em especial nos descolamentos da porção inferior da retina, já que pela sua menor densidade em relação ao vítreo, tende a migrar para a porção superior do globo ocular. Além disso o óleo de silicone também apresenta problemas, como redescolamentos da retina e complicações tardias freqüentes como catarata, glaucoma e alterações corneanas (Chan & Okun, 1986).

I.3 - Toxicidade dos perfluorcarbonos

Os dados da literatura são controversos quanto à toxicidade dos perfluorcarbonos. PFCLs puros são considerados geralmente inertes (Peyman *et al.*, 1995), sendo a toxicidade presente neles, como alguns estudos indicam, causada por impurezas como compostos com hidrogênio e pontes insaturadas de carbono que ocasionariam uma reação inflamatória e o dano à retina (Velikay *et al.*, 1995).

Alguns autores descrevem em seus experimentos que a retenção no vítreo de um pequeno volume de perfluorocarbono líquido depois de seu uso intra-operatório não induz resposta tóxica (Green *et al.*, 1993). Experimentos baseados em estudos histopatológicos

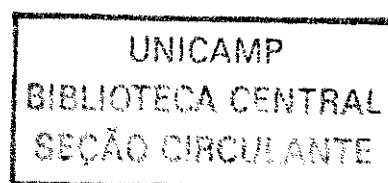
em animais demonstraram que pequenas gotículas residuais intravítreas (0,1ml) foram bem toleradas por até seis meses (Chang *et al.*, 1991).

Outros autores afirmam que os PFCLs deixados nos olhos dos pacientes após a cirurgia, para atuar como agentes tamponantes, podem causar reações inflamatórias e danos celulares, como compressão e destruição da arquitetura normal da retina, com sua desorganização, alterações degenerativas dos fotorreceptores, ativação dos macrófagos na retina e redução no número de células (Chang *et al.*, 1991; Meller *et al.*, 1998). Há, inclusive, a sugestão de múltiplas lavagens da superfície da retina ao final da cirurgia, com solução salina tamponada, para diminuir ao mínimo a possibilidade de gotículas de perfluorcarbono residuais (Winter *et al.*, 1999). Entretanto, não ficou claro se esses achados deveriam ser atribuídos a danos tóxicos ou mecânicos, observando-se um efeito progressivo proporcional ao tempo de contato desta substância com a retina (Velikay *et al.*, 1993; Meller *et al.*, 1998).

Em revisão da literatura sobre o uso de PFCLs, Peyman *et al.* (1995) relatam que a possível toxicidade seria decorrente mais de um efeito físico que de uma toxicidade química. Liang & Peyman (1999), estudando a tolerância a longo prazo de uma mistura com diferentes concentrações de perfluorcarbonos líquidos, o perfluoroctano e perfluoroperhydrophenanthrene, em olhos de coelhos, não observaram alterações de natureza tóxica. Também estudos utilizando cultura de células, com perfluorcarbonos líquidos concluíram que o dano celular encontrado era ocasionado pelo efeito compressivo, e não tóxico, do produto utilizado (Mertens *et al.*, 2000).

A tolerância intra-ocular para dois PFCLs, o perfluoroctano e o perfluoropolieter, foi pesquisada por Eckardt *et al.* (1991) de maneira experimental, com a observação de achados histológicos indicando danos de natureza tóxica desses produtos na retina inferior, que foi a parte do tapete retiniano que esteve em contato com os dois PFCLs. Também outros autores, em estudos experimentais, avaliando o uso de outros PFCLs como substitutos vítreos de longo prazo, concluíram que, mesmo estando altamente purificados, eles são tóxicos à retina. (Velikay *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1987).

A análise das alterações observadas em recentes trabalhos realizados *in vitro*, com diferentes culturas de células sob o efeito de PFCLs, mostra conclusões diversas sobre a natureza do dano celular. Mertens *et al.* (2000), ao avaliarem a capacidade proliferativa e a



viabilidade de culturas de células do epitélio pigmentado incubadas com um PFCL, o perfluorodecalin, sugerem que o dano celular não seria de uma toxicidade direta sobre as células *in vitro*, mas, sim, um efeito mecânico ou indireto no metabolismo celular, impedindo as trocas metabólicas normais entre as células e o meio. Meller *et al.* (1998), analisando a possível toxicidade de dois PFCLs, o perfluorodecalin e o perfluorooctano em cultura de células ganglionais nervosas pressupõem que as alterações celulares encontradas seriam decorrentes de outros mecanismos fisiopatológicos que não apenas puras alterações mecânicas.

Células Vero submetidas ao efeito do perfluorooctano, quando comparadas com células sob um peso inerte similar, para controle, apresentaram dano significativamente maior, mostrando que o PFOC exerce em adição, ao efeito compressivo, um efeito tóxico sobre as células (Estacia *et al.*, 2002).

Estudos experimentais realizados sobre a toxicidade dos PFCLs no segmento anterior de olhos também apresentam diferentes conclusões quanto ao dano celular, com os autores sugerindo uma ação de toxicidade dessas substâncias ao endotélio da córnea, com diminuição do seu número e alterações na morfologia nas áreas em contato com o produto (Queiroz Jr. *et al.*, 1992; Stolba *et al.*, 1999). Para Mertens *et al.* (2000), as alterações observadas só aconteceriam na presença de um contato contínuo dessas substâncias com a córnea. Essas alterações celulares seriam, portanto, contato-dependentes e ocasionadas pela formação de uma barreira que impediria a nutrição do endotélio, com a conseqüente descompensação da córnea.

I.4 - Os Alcanos Semifluorinados

Na tentativa de se solucionar esses dois fatores que não permitiram o uso dos PFCLs como substituto vítreo de longo prazo - o efeito compressivo muito intenso e o discutível efeito tóxico -, novos produtos foram lançados no mercado. São os mais recentes desenvolvimentos dos perfluorocarbonos líquidos, chamados de “alcanos semifluorinados” (ASF) e que consistem na união de um perfluorocarbono com um hidrocarbono, o que diminui a porção fluorinada na cadeia molecular, levando a uma menor densidade e ao aumento de suas propriedades lipofílicas (Hoerauf *et al.*, 2001). Sua biocompatibilidade e

seu menor peso específico indicariam seu uso como substitutos vítreos de longo prazo (Kirchhof, 1999).

Um dos ASF de uso oftalmológico estudados é o perfluorohexiloctano (F_6H_8). Como os outros PFCLs, os ASFs são lípidos, com índice de refração que varia entre 1.30 a 1.34, portanto próximo ao da água (1.33), o que é desejável a uma substância que deve ficar um maior tempo no olho até que aconteça a adesão da retina ao epitélio pigmentado, pois acarretaria uma mínima alteração do poder de refração ocular pós-operatório. Os ASF são solúveis em PFCL, hidrocarbonos e óleo de silicone e têm baixa viscosidade como os PFCLs, conservando, portanto, as características destes de fácil introdução e remoção do olho através de cânulas de diâmetro pequeno, embora, com isso, também mantenham a tendência de se dispersar em pequenas bolhas. (Kobuch *et al*, 2001) A propriedade dos ASFs de serem solúveis em óleo de silicone permitiria também o uso deste produto para dissolver e limpar gotículas de óleo de silicone aderidas sobre lentes intra-oculares, uma complicação que pode ocorrer nas cirurgias de vítreo-retina realizadas em pacientes também operados de catarata. (Langefeld *et al*, 1999; Zeana *et al.*, 2000 (a)).

A característica do F_6H_8 de ter menor gravidade específica, quando comparado com outros PFCLs, seria vantajosa para a manipulação de áreas mais delicadas da retina, como nas cirurgias para rotação da região da mácula (Kobuch *et al*, 2001), e permitiria seu uso pós-operatório como agente tamponante, mantendo a retina na posição desejada, teoricamente com menor risco de dano celular (Wong & Lois, 2000). Já está estabelecida a eficácia dos PFCLs como ferramenta intra-operatória na cirurgia de vítreo-retina, mas seu uso como substituto vítreo de longo prazo mostrou-se limitado devido às complicações advindas do maior tempo de contato com as estruturas intra-oculares (Stolba *et al.*, 1997). Os ASFs estão sendo avaliados como uma alternativa terapêutica ao óleo de silicone para tamponamento intra-ocular de longo prazo, especialmente da retina inferior (Zeana *et al.*, 2000 (b); Kirchhof *et al.*, 2002).

I.5 - Abordagem experimental

A avaliação da ação do PFOC e do F_6H_8 em cultura de células difere das condições encontradas no olho humano, com as limitações inerentes ao modelo experimental utilizado, mas o estudo das alterações estruturais das células em cultura fornece uma

ferramenta importante para avaliar a toxicidade dos PFCL e dos ASF de forma direta sobre as células, excluindo qualquer outro fator tecidual ou vascular que possa estar presente. A cultura de células permite, ainda, uma avaliação rápida, de custo relativamente baixo, de alta confiabilidade e de grande reprodutibilidade.

Durante a concepção de nosso experimento, optamos por utilizar as células Vero como modelo experimental. As células Vero são uma linhagem celular fibroblástica recomendada internacionalmente para estudos de citotoxicidade e interações célula-substrato em pesquisas com biomateriais por normatizações internacionais (ISO 10993-5, 1992(E); Kirkpatrick, 1992). É uma linhagem celular bastante utilizada em nosso laboratório, em experimentos com transformação celular (Genari *et al.*, 1996), interação com biomateriais (Santos *et al.*, 2001; Haas *et al.*, 2001) e citotoxicidade (Malmonge *et al.*, 1999). Dessa forma, temos um conhecimento bastante significativo sobre o padrão de comportamento desse tipo celular em diferentes condições o que facilita a interpretação dos resultados obtidos.

Este estudo foi planejado com três controles: como *controle de peso*, foram utilizadas lamínulas de vidro, fazendo a compressão mecânica proporcional ao peso e área dos 0,1ml de PFOC ou F_6H_8 utilizado, porém inertes no que tange à toxicidade. Como *controle negativo* utilizaram-se as células cultivadas em meio de cultura na ausência de qualquer outro tratamento. Como *controle positivo* de citotoxicidade, utilizaram-se adesivos de silicone (Rhodiastic), com peso e área proporcional à ocupada pelo PFOC ou F_6H_8 .

Todos os experimentos feitos neste trabalho estão de acordo com normas internacionais para interação com biomateriais e para citotoxicidade (ASTM F813-83, 1983; ISO 10993-5, 1992(E); Kirkpatrick, 1992).

II - OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho é analisar as possíveis alterações morfológicas das células Vero cultivadas na presença do PFOC e do F_6H_8 , assim como a citotoxicidade dos respectivos materiais.

Objetivos específicos

- Avaliar as possíveis alterações morfológicas das células Vero cultivadas na presença do PFOC e do F_6H_8 , por meio de microscopia ótica e eletrônica de varredura.
- Avaliar a citotoxicidade dos respectivos materiais, por meio de testes de toxicidade direta e indireta, seguindo recomendações normativas internacionais vigentes.
- Analisar o citoesqueleto, especificamente a disposição dos filamentos de actina, relacionando-os com as possíveis modificações na morfologia celular, através da imunocitoquímica, das células que foram incubadas com o PFOC e F_6H_8 .
- Caracterizar as alterações citoquímicas encontradas nas células Vero tratadas com o PFOC e F_6H_8 .
- Comparar qualitativamente, através dos parâmetros de estudo utilizados, o desempenho do perfluorooctano (PFOC) em relação ao perfluorohexyloctano (F_6H_8).

III – ARTIGOS CIENTÍFICOS

CAPÍTULO I

THE CYTOTOXICITY IN VERO CELLS OF A PERFLUOROCARBON USED IN VITREORETINAL SURGERY

Paulo Estacia^{1,2}, Arnaldo Rodrigues Santos Jr.^{1,3}, Patrícia da Luz Moreira¹ and Selma Candelária Genari^{1,3}

¹Department of Cell Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP,

²Faculty of Medicine, University of Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS and

³Regional University Center of Espírito Santo do Pinhal (CREUPI), Espírito Santo do Pinhal, SP, Brazil.

ABSTRACT

Perfluoro-n-octane is a high-density liquid perfluorocarbon used as a long-term vitreous replacement in vitreoretinal surgery. In this study, we assessed the toxicity of perfluoro-n-octane (PFOC) on Vero cells using an indirect toxicity test, scanning electron microscopy and immunocytochemistry. For indirect toxicity test, Vero cells were cultured for 12 h with PFOC extracts in 96-well plates and the plates were, then, read at 540 nm. For direct toxicity, Vero cells were incubated with 0.1 ml of perfluoro-n-octane alone. Glass coverslips were used as inert control for weight, to produce mechanical compression similar in weight and area to that caused by perfluoro-n-octane. Cells cultured without PFOC were used as a negative control. Silicone bands with a weight and area similar to those of perfluoro-n-octane served as a positive control for toxicity. The indirect toxicity test showed that perfluoro-n-octane did not release soluble toxic substances that affected cell growth. In the direct toxicity test, the cells in the control group had homogeneously distributed actin filaments, although scanning electron microscopy revealed some vesicles on the cell surface. In the controls for weight, cytoplasmic retraction and the formation of thin cellular prolongations were seen. Cells incubated with perfluoro-n-octane showed greater changes compared to those seen in cells under a similar control weight. Silicone-treated cells had an irregular or fragmented morphology. These results show that, in addition to its compressive action on cultured cells, perfluoro-n-octane may also exert a toxic effect.

Key words: Perfluorocarbon liquids, perfluorooctane, Vero cells, cytotoxicity

INTRODUCTION

Vitreoretinal surgery is a complex procedure which often has a less positive functional and anatomical outcome than other eye surgeries because it is not always efficient in maintaining the retina reattached after surgery. Depending on the size of the tear and extension of the detachment, fibrous proliferation may occur and keep the retina detached. The use of perfluorocarbon liquids (PFCLs), which are synthetic compounds with fluoro-carbon bonds, was introduced in ophthalmology in an attempt to reattach the retina by using more effective and less traumatic methods. PFCLs with physical properties such as immiscibility with water and blood [16], optical transparency and a high specific weight

(increased weight relative to the same volume), became hydrokinetic tools for stabilizing the retina in the posterior pole of the eye during surgery [3,14]. These substances have a low viscosity, thus facilitating their insertion into and removal from the eye. Ideally, the liquid should remain in the eye for some time after surgery in order to guarantee anatomic reapposition and attachment of the retina [18].

Perfluoro-n-octane is the most widely used PFCL in ophthalmology. There is some controversy in the literature about the toxicity of perfluorocarbons. Pure PFCLs are usually considered inert. The toxic effects of PFCLs may be caused by impurities with nitrogen, hydrogen on unsaturated carbon bonds [16]. Small amounts of residual perfluorocarbon in the vitreous humor after its intraoperative use are not toxic [7]. Histopathological evaluation has shown that treatments with intravitreal drops (0.1 ml) of perfluorocarbons is well tolerated for up to six months [4].

Correspondence to: Dr. Selma Candelária Genari, Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6109, CEP 13084-971, Campinas, SP, Brasil. Tel/Fax: (55) (19) 3788 6111, E-mail: sgenari@nutricell.com.br

Studies have suggested that PFCLs retained postoperatively in patients' eyes may act as buffering agent and may cause inflammatory reactions and cellular injury involving compression, structural disarrangement of the retina, photoreceptor damage, the accumulation of macrophages in the retina, and a reduction in the number of cells [4,13]. However, it is unclear whether these effects result from toxicity or mechanical injury. Progressive damage proportional to the length of time the retina was in contact with this substance has been reported [13,20].

In a review of the uses of PFCLs, Peyman *et al.* [16] pointed out that toxicity might have a physical rather than chemical nature. Liang and Peyman [11] assessed the long-term tolerance to a mixture in which different concentrations of perfluorocarbon liquids, perfluoro-*n*-octane, and perfluoroperhydropheanthrene were used in rabbit eyes, and found no toxic effects. In addition, in cells cultured with perfluorocarbon liquids, injury resulted from compression by weight of the compound rather than through a toxic action [14]. Green *et al.* [7] reported that in rabbits the retention of more than 25% of perfluoro-*n*-octane (PFOC) in the vitreous cavity for up to seven weeks did not result in toxic effects.

In contrast, Eckardt *et al.* [5] assessed the intraocular tolerance of two PFCLs (perfluoro-*n*-octane and perfluoropolyether) and concluded that the histological alterations in the lower part of the retina indicated toxicity. Similarly, other studies have also shown that the use of highly purified PFCLs as long-term vitreous replacements can be toxic to the retina [2,20].

The use of cell cultures to assess the bioactivity and cytotoxicity of biomaterials has overcome some of the limitations of studies *in vivo*. The aim of this study was to examine the effect of perfluoro-*n*-octane (PFOC) in cultured Vero cells as these cells have been used to study cell growth and differentiation as well as interactions with biomaterials [8,6,17] and cytotoxicity [12], and are recommended for such investigations in standard protocols [1,9,10].

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

Vero cells, a fibroblastic cell line established from renal cells of the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*), were used. The cells were maintained in Ham's F10 medium (Sigma

Chemical Co., St. Louis, MO, USA) with 10% fetal calf serum (FCS, by Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brazil) at 37°C.

Perfluoro-*n*-octane (PFOC):

The PFOC (Ophthalmos Ltda.) used in this study had the following chemical features: empirical and molecular formula = C_8F_{18} , molecular weight = 438, specific gravity = 1.76 g/ml, viscosity = 0.8 (centistoke, at 25°C), refractive index = 1.27, and surface tension = 14 dyne/cm. The product (purity ~ 100%) was purchased in sterile form (5 ml bottles) suitable for medical use. When required, PFOC was added slowly to the culture medium to avoid the formation of bubbles.

Indirect cytotoxicity test

PFOC was added to the culture medium at a final concentration of 2 g/ml and then incubated at 37°C for 48 h without shaking. After this period, the medium was harvested and the PFOC present was discarded. Using this approach, it was possible to assess the potential effect of substances released by PFOC into the culture medium. The indirect cytotoxicity test and the above extract were prepared and tested according to the ISO-10993 [9] and ASTM F813-83 [1] international standards.

Quantitative analysis of extracts in cultured cells

The method described by Murakami *et al.* [15] was used for quantitative analysis of the extracts in cultured cells. One hundred micro liters of a Vero cell suspension containing 1.0×10^6 cells/ml of Ham's F10 medium with 10% FCS were transferred to the wells of a 96-well culture plate (Corning Co., Cambridge, MA, USA) and cultured for 12 h at 37°C. After this incubation, the culture medium was removed and 100 µl of new medium containing the PFOC extract was added to each well. After 12 h at 37°C, the extracts were removed and the cells were washed with 0.1 ml of 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 at 37°C, then fixed in 10% formalin, washed in PBS and stained with crystal violet 0.05% (in 20% methanol). Before processing for quantitative analysis, the morphology of control and PFOC-treated cells was documented. The samples were then washed twice in PBS and incubated in 0.1 M sodium citrate (in 50% ethanol, pH 4.2) for 12 h. The plate with the remaining cells was then read at 540 nm in a Multiskan Bichromatic Version 1.06 microplate reader. An extract of culture plate material (propylene) was used as a negative control (no cytotoxic effect). A total of 16 samples were used in each experiment.

Direct cytotoxicity test

The direct cytotoxicity test consisted of assessing the possible toxic effects of PFOC in direct contact with Vero cells. A suspension containing 1×10^5 cells/ml of Ham's F10 medium with 10% FCS was inoculated 1 ml/well in a 24-well plate (Corning). The plates were incubated at 37°C for 12 h. After the incubation, 0.1 ml of PFOC was added on the cell layer. Glass coverslips were used as weight control to produce mechanical compression similar to the weight and area of the PFOC used. Cells cultured in

a PFOC-free medium and without coverslips were used as a negative control. Silicone adhesive membranes (provided by Dr. Eliana A. R. Duck, Department of Material Engineering, Faculty of Mechanical Engineering, Unicamp) was used as a positive control for cytotoxicity and had a weight and area proportional to those of PFOC. The samples were collected and fixed 12 h after the addition of PFOC. This contact time was established based on preliminary experiments (shorter times produced little change whereas longer times led to cell destruction and precluded any type of analysis). The cells in all treatments were analyzed morphologically and immunocytochemically.

To determine the area of the wells without cells in the different experimental conditions (an indicator of cell death), the cells were cultured as described above, fixed in Karnovsky solution, and stained with toluidine blue at pH 7. For cells incubated with square glass coverslips (negative control) or square silicone bands (positive control) the area was determined by multiplying the base by the height value. The PFOC area (circular) was determined by πr^2 , where r is the radius of the circle. The measurements were made with calipers ($n = 6$).

Immunocytochemical analysis

Actin was detected immunocytochemically in cultured cells. After a 12 h incubation with the test agent, the culture medium was removed and the plates were washed with PBS at 37°C. The material was fixed in Karnovsky solution containing 0.2 % Triton X100 for 30 min, washed with PBS at 37°C and incubated with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma) for 1 h at 4°C. The cells were incubated with primary anti-actin monoclonal antibody (1:200 dilution, Sigma, clone AL - 40) for 18 h at 4°C. After washing in PBS with 1% BSA, the cells were incubated for 1 h with a FITC-conjugated secondary anti-mouse IgG antibody (1:200 dilution, Sigma), then washed again with PBS and 1% BSA, before mounting in Vectashield. The cells were examined using an Olympus IX-50 inverted microscope fitted with fluorescence filters.

Scanning electron microscopy (SEM)

Cells cultured as described above were fixed in 2.5% paraformaldehyde/glutaraldehyde (Sigma) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, then washed in phosphate buffer followed by post-fixation with 1% osmium tetroxide (Sigma) and dehydration in an ethanol series. The cells were then critical point dried (Balzers CPD0030) and gold sputtered (Balzers 050) before being analyzed in a scanning electron microscope (Jeol JSM-5800 LV).

Statistical analysis

The results of the indirect and direct cytotoxicity test were analyzed using one-way ANOVA, with a significance level of $p < 0.05$.

RESULTS

Areas without cells in the different treatments

The areas without cells following incubation with PFOC, silicone and coverslips (the latter two being positive and negative controls, respectively) were 0.329 ± 0.088 , 0.277 ± 0.005 and $0.401 \pm 0.051 \text{ cm}^2$, respectively. There were no significant differences among these values.

Indirect cytotoxicity test

The absorbances at 540 nm were 0.306 ± 0.021 and 0.340 ± 0.030 , for control and PFOC-treated cells, respectively. Thus, PFOC did not release soluble toxic substances into the culture medium. These findings agrees with the similar morphology of PFOC-treated and control cells seen following crystal violet staining (Fig. 1).

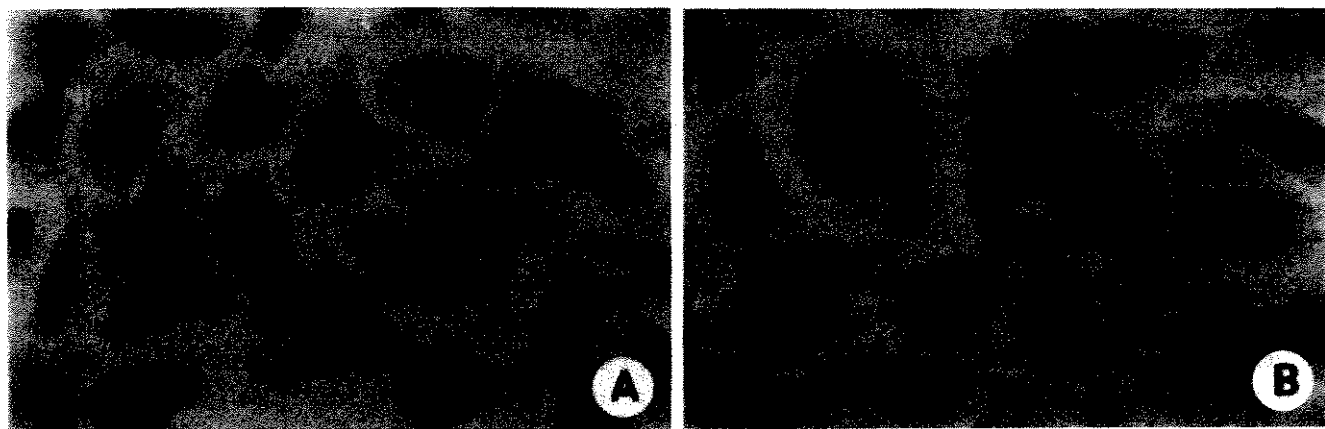


Figure 1. Light microscopy (crystal violet staining) of the indirect effect of a PFOC extract on the morphology of cultured Vero cells. (A) Control Vero cells, (B) PFOC extract-treated Vero cells. Note the flattened irregular morphology and 1-2 nucleoli per cell. Scale bar = 50 μm .

Immunocytochemical analysis

Staining with anti-actin monoclonal antibody markers indicated that in the negative controls the cells formed a semiconfluent monolayer, with thin actin filaments filling the cytoplasm. No stress fibers or other organized forms of actin filaments were seen (Fig. 2A,B). Cells cultured for 12 h under the weight of a glass coverslip showed more irregular contours along their borders. Actin was observed more clearly close to the cell periphery (Fig. 2C,D). In cells treated with silicone (a weight equivalent to that of PFOC – positive control), the morphology was irregular and fragmented because of disorganized actin filaments (Fig. 2E). Cells in direct contact with PFOC showed irregular morphology or fragmentation, but with less actin, although there were small, actin-rich cell fragments. No other cells were observed apart from those in the transition zone (Fig. 2F,G).

Scanning electron microscopy

In scanning electron microscopy, the negative controls showed a semiconfluent cellular monolayer of flattened cells with some vesicles on the cell surface (Fig. 3A,B). Cells cultured for 12 hours under the weight of glass coverslip were irregular, with very thin edges and cytoplasmic retraction (Fig. 3C,D). Cells in direct contact with PFOC showed a markedly irregular morphology in the transition zone. The borders of the cells were retracted and there were cytoplasmic prolongations (Fig. 3E,F). Cell fragments were seen following direct contact with PFOC.

DISCUSSION

Recent studies on the effect of PFCLs on cell proliferation and viability have suggested that cellular injury may not be caused by direct toxicity, but rather by a mechanical or other indirect effect on cell metabolism. Other physiopathological mechanisms may also be involved [14].

In this study, we examined the possible mechanical and toxic effects of PFOC on cultured Vero cells. Some studies *in vitro* have used emulsified perfluorocarbons without consideration for their compressive effect on cells. Meller *et al.* [13] tested these liquids directly on cells to assess the damage caused by compression, but did not include a control that would produce “inert”

non-toxic compression [14], a weight similar in size and area to the products tested on the cell layer. Such controls were included in our experiments.

The indirect cytotoxicity test showed that PFOC did not release substances harmful to cells. This finding agrees with the conclusions of others that alterations are contact-dependent and are observed after a short period of contact [19]. The areas showing cell death (i.e., no cells) were not significantly different among the treatment, an observation which further corroborated the lack of indirect cytotoxicity.

Marked morphological changes occurred in cells treated with PFOC, as shown by the immunocytochemical analysis for actin filaments. The cytoskeletal changes observed agreed with Meller *et al.* [13], who also reported toxicity to structural proteins (neurofilaments and tubulin) based on immunocytochemical analysis. Structural damage was also seen in scanning electron microscopy. The decrease in the number of cells was significant, with the changes caused by PFOC being more intense than those in the cells cultured on glass slides.

Although the cytotoxicity tests revealed that PFOC released no toxic substances into the culture medium, PFOC did produce cellular toxicity through direct contact with the cells. Similar findings were reported by Velikay *et al.* [20,21], who assessed the retinal effects of PFCL of a highly purified and a nonpurified formulation. The alterations observed included retinal necrosis in the PFCL transition zone (regardless of the formulation), which increased with the contact time, i.e. the changes were not simply a mechanical effect. These authors noted that the alterations caused by the unpurified formulation started earlier. Cellular injury was also dose-dependent, as described by Meller *et al.* [13], when different concentrations of emulsified perfluorocarbons were added to neuronal cell cultures. These alterations, which were restricted to the area in contact with PFOC, agree with the other studies reporting cellular changes only when the tissues were in contact with the test substance [2,5].

In conclusion, although a mechanical effect of PFOC may have altered the normal cell activity, our results also suggest the involvement of other mechanisms, as previously reported [14,19]. Such mechanisms may involve a direct toxic action on the cells.

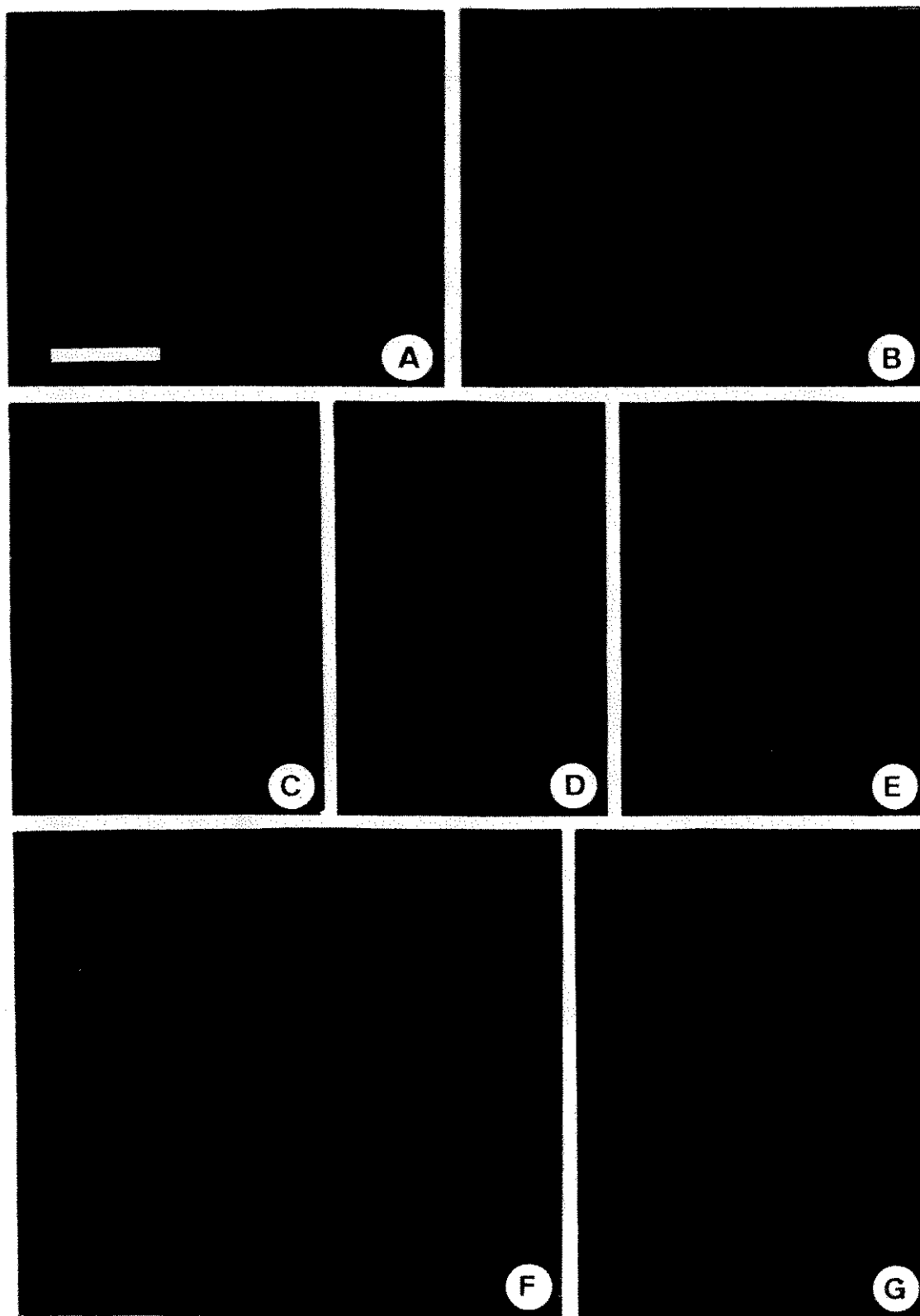


Figure 2. Immunocytochemical analysis of Vero cells cultured for 12 h and incubated with anti-actin monoclonal antibodies. A) and B), Negative controls (no chemical or mechanical action), C) and D), Cells cultured with glass coverslips (weight equivalent to that of PFOC), E) Cells cultured with silicone (weight equivalent to that of PFOC), F) and G), Cells under the compressive effect of PFOC – transition zone. Scale bar = 100 μ m (B, D, E and G) or 50 μ m (A, C, and F).

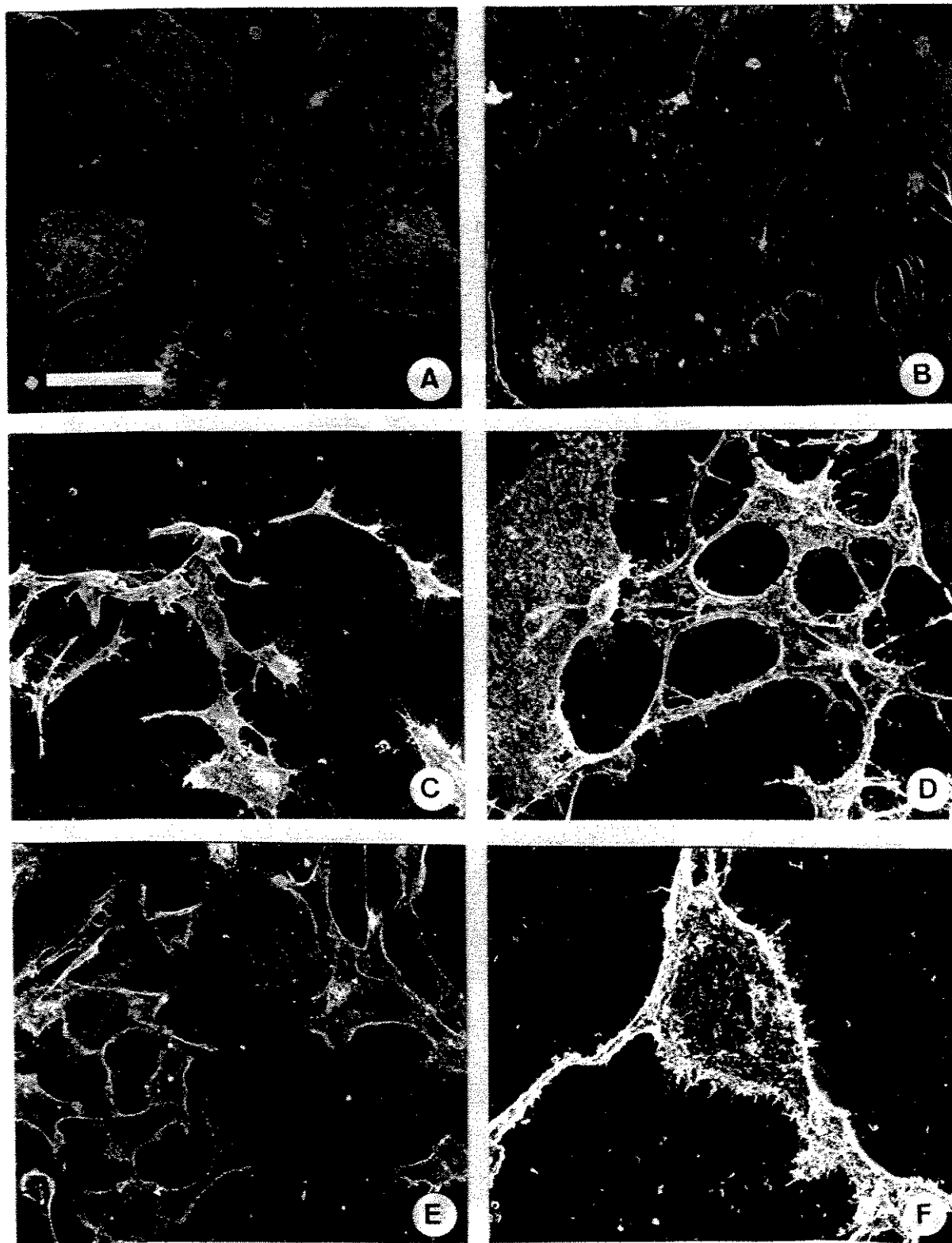


Figure 3. Scanning electronic microscopy of Vero cells. A) and B), Negative (no chemical or mechanical action), C) and D), Cells cultured with glass coverslips (weight equivalent to that of PFOC), E) and F), Cells under the compressive effect of PFOC. Scale bar = 70 μm (B, D and F) or 20 μm (A, C and E).

REFERENCES

1. ASTM F813-83. Standard practice for direct contact cell culture evaluation of materials for medical devices.
2. Chang S (1987) Low viscosity liquid Fluorochemicals in vitreous surgery. *Am. J. Ophthalmol.* **103**, 38-43.
3. Chang S, Sparrow JR, Iwamoto T, Gershbein A, Ross R, Ortiz R (1991) Experimental studies of tolerance to intravitreal Perfluoro-N-octane liquid. *Retina* **11**, 367-374.
4. Chang S, Zimmerman N, Iwamoto T, Ortiz R, Faris D (1987) Experimental vitreous replacement with Perfluorotri-butylamine. *Am. J. Ophthalmol.* **103**, 29-37.
5. Eckardt C, Nicolai U, Winter M, Knop E (1991) Experimental intraocular tolerance to liquid Perfluorooctane and Perfluoropolyether. *Retina* **11**, 375-384.
6. Genari SC, Dolder MAH, Wada MLF (1996) Scanning and transmission electron microscopy of a transformed Vero cells, with altered *in vitro* growth characteristics. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **28**, 565-572.
7. Green K, Slagle T, Chaknis M, Cheeks L, Chang S (1993) Perfluorocarbon effects on rabbit blood-retinal barrier permeability. *Ophthalmic Res.* **25**, 186-191.
8. Haas VR, Santos Jr AR, Wada MLF (2001) Behaviour of fibroblastic cells cultured in collagen I using the sandwich technique. *Cytobios* **106 (Suppl. 2)**, 255-267.
9. ISO 10993-1 (1992) Biological evaluation of medical devices-Part. 5-Tests for cytotoxicity: "in vitro" methods.
10. Kirkpatrick CJ (1992) Biological testing of materials and medical devices. A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity *in vitro*. *Reg. Affairs* **4**, 13-32.
11. Liang C, Peyman G (1999) Tolerance of extended term vitreous replacement with perfluoro-n-octane and perfluoroperhydrophenanthrene mixture (Phenotane). *Retina* **19**, 230-237.
12. Malmonge SM, Zavaglia CAC, Santos Jr AR, Wada MLF (1999) Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de poliHEMA: um estudo *in vitro*. *Rev. Bras. Eng. Biomed.* **15**, 49-54.
13. Meller D, Augustin AJ, Spitznas M, Lutz J, Meller K (1998) Effect of different perfluorochemicals on dorsal root ganglion cells *in vitro*. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **236**, 182-187.
14. Mertens S, Bednarz J, Richard G, Engelmann K (2000) Effect of perfluorodecalin on human retinal pigment epithelium and human corneal endothelium *in vitro*. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **238**, 181-185.
15. Murakami N, Fukuchi S, Takeuchi K, Hori T, Shibamoto S, Ito F (1998) Antagonistic regulation of cell migration by epidermal growth factor and glucocorticoid in human gastric carcinoma cells. *J. Cell. Physiol.* **176**, 127-137.
16. Peyman G, Schulman J, Sullivan B (1995) Perfluorocarbon liquids in Ophthalmology. *Survey Ophthalmol.* **39**, 375-395.
17. Santos Jr AR, Barbanti SH, Duek EAR, Dolder MAH, Wada RS, Wada MLF (2001) Growth and differentiation of Vero cells on poly(L-lactic acid) membranes of different pore diameters. *Artif. Organs* **25**, 7-13.
18. Sparrow J, Jayakumar A, Berrocal M, Ozmert E, Chang S (1992) Experimental studies of the combined use of vitreous substitutes of high and low specific gravity. *Retina* **12**, 134-140.
19. Stolba U, Krepler K, Velikay M, Binder S (1999) Anterior segment changes in rabbits after experimental aqueous replacement with various amounts of different perfluorocarbon liquids. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **237**, 501-507.
20. Velikay M, Stolba U, Wedrich A, Li Y, Datlinger P, Binder S (1995) The effect of chemical stability and purification of perfluorocarbon liquids in experimental extended-term vitreous substitution. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **233**, 26-30.
21. Velikay M, Wedrich A, Stolba U, Datlinger P, Li W, Binder S (1993) Experimental long-term vitreous replacement with purified and nonpurified Perfluorodecalin. *Am. J. Ophthalmol.* **116**, 565-570.

Received: June 11, 2002

Accepted: October 14, 2002

CAPÍTULO II

***Assessment of the possible toxic effect of a semifluorinated
alkane on Vero cell culture***

Paulo Estacia ^{1,2}; Arnaldo Rodrigues Santos Jr. ^{1,3}; Selma Candelária Genari ^{1,3}

1. Department of Cell Biology, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, CP 6109, CEP 13084-971, FAX: +55.19.37886111.
2. School of Medicine, Universidade de Passo Fundo - UPF, Passo Fundo, RS, CEP 99100-000.
3. Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal – CREUPI, Espírito Santo do Pinhal, SP, CP 05, CEP 13990-000. Fax: +55.19.6513579.

Running title: Effect of a perfluorohexyloctane on Vero cells.

Requests and reprints to: Selma Candelária Genari, Depto. de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Cx Postal 6109, CEP 13084-971, Campinas, São Paulo, Brasil. Phone/fax +55.19.37886111. E-mail: sgenari@nutricell.com.br

RESUMO

Os perfluorocarbonos líquidos (PFCLs) são usados em cirurgias oftalmológicas de vítreo-retina, servindo não apenas como ferramenta intra-operatória, mas também como agentes tamponantes intra-oculares. Entretanto, alguns autores afirmam que os PFCLs podem causar reações inflamatórias, danos celulares e destruição da arquitetura normal da retina. Na tentativa de se solucionar estes inconvenientes, foram desenvolvidos os alcanos semifluorinados (ASF). Este trabalho avaliou o potencial de um ASF como substituto vítreo de longo prazo, o perfluorohexiloctano (F_6H_8), em condições controladas por meio de cultura celular. Foi feita uma análise da citotoxicidade indireta, onde as células entram em contato apenas com elementos solúveis que pudessem ser eliminados pelo perfluorohexiloctano. Como resultado, observou-se que o referido produto não apresenta toxicidade indireta. Foi feita então a avaliação da toxicidade direta, ou seja, a toxicidade mediada pelo contato do perfluorohexiloctano por meio de microscopia eletrônica de varredura e da imunocitoquímica para a actina. Utilizaram-se como controle células em meio de cultura livre de qualquer tratamento, um controle positivo para toxicidade (adesivos de silicone), que apresentam comprovado efeito tóxico, e um controle de peso (lâminulas de vidro) que exercesse uma compressão mecânica similar à quantidade de perfluorohexiloctano utilizada no experimento. Os ensaios de toxicidade direta mostraram que as alterações celulares promovidas pelo perfluorohexiloctano eram similares às aquelas feitas pelo controle peso e distintas das alterações do controle de toxicidade. Assim, concluiu-se que o perfluorohexiloctano não apresenta efeito tóxico, apenas compressivo, sobre as células em cultura.

Palavras chave: perfluorohexiloctano, cultura celular, toxicidade, oftalmologia, retina.

ABSTRACT

Perfluorocarbon liquids (PFCLs) are used in vitreoretinal surgery, not only as an intraoperative tool, but also as intraocular tamponading agents. However, some authors state that PFCLs may cause inflammatory reactions, cellular injury and destruction of the normal retinal architecture. In an attempt to avoid these effects, semifluorinated alkanes (SFA) were developed. We assessed the potential use of an SFA known as perfluorohexyloctane (F_6H_8) as long-term vitreous replacement under highly controlled cell culture conditions. To begin with, we analyzed indirect cytotoxicity, where the cells only come into contact with soluble elements that can be eliminated by perfluorohexyloctane. The analysis led us to the conclusion that this product does not present indirect toxicity. We therefore analyzed direct toxicity (contact toxicity) of perfluorohexyloctane by means of scanning electronic microscopy and immunocytochemistry reagents for actin. Cells embedded in a treatment-free culture medium were used as control – a positive control for toxicity (silicone bands), with an undeniably toxic effect on cells, and a weight control (glass slides) that produced a mechanical compression similar to the amount of perfluorohexyloctane used in the experiment. Our direct toxicity tests showed that cellular alterations caused by perfluorohexyloctane were similar to those produced by the weight control and different from toxicity control. In conclusion, perfluorohexyloctane has a compressive rather than a toxic effect on cultured cells.

Key words: perfluorohexyloctane, cell culture, toxicity, ophthalmology, retina.

INTRODUCTION

Vitreoretinal surgeries have been improved with vitrectomy, which allows vitreous humor replacement and retinal manipulation, thus providing an efficient treatment option for the reattachment of the retina to its original position, also maintaining its nutrition and functional capacity. This aim is not always easily achieved, due to the process of fibrous proliferation and consequent traction, which often keeps the retina detached.

The use of perfluorocarbon liquids (PFCLs) for some years as a tool for the reattachment of the retina to its anatomical position in a less traumatic fashion has largely facilitated vitreoretinal surgery. The higher specific gravity of these liquids causes the hydrokinetic stabilization of the retina during surgery, displacing the subretinal fluid (Mertens et al., 2000.) These substances not only serve as an intraoperative tool, but their use as intraocular tamponading agents is also considered. In this case, they are inserted during surgery for reattachment of the retina and remain postoperatively in the eye until the retina is properly attached and decrease the risk for retinal redetachment.

Perfluorocarbons have been applied in a wide variety of conditions since 1989, when they were initially used for the repair of giant retinal tears (Mathis et al., 1992). Other uses include complicated cases of retinal detachment (Chang et al., 1989; Glaser et al., 1991), diabetic vitreoretinopathy (Chang et al., 1988) and control of intraoperative vitreous hemorrhage (Moreira Jr. et al, 1997.) PFCLs, as shown by Sparrow et al. (1992), are efficient in maintaining the retina attached in experimentally induced retinal detachments.

Among the PFCLs used in ophthalmology are perfluorooctane, perfluorodecalin, perfluorotributylamine, and perfluoroperhydrophenanthrene, all of which have great capacity to carry and release both oxygen (O_2) and carbon dioxide (CO_2 .) Perfluorooctane is the most widely used PFCL in our setting, allowing enhanced visibility of the meniscus formed in the interface between the PFOC and the balanced salt solution used in the surgery (Liang and Peyman, 1999.) These different PFCLs are efficient in reattaching the retina (Sparrow et al., 1992) and the decision on which perfluorocarbon to use will be

based on several aspects, such as surgeon's experience, availability and cost (Loewenstein et al., 2000.)

Some authors state that PFCLs, when left in the patients' eyes after surgery, to act as tamponading agents, may cause cellular injury (Estacia et. al, 2002) and inflammatory reactions, such as compression and destruction of the normal retinal architecture, resulting in disorganization, degenerative photoreceptor disorders, activation of macrophages in the retina and reduction in the number of cells (Chang et al., 1991; Meller et al., 1998; Winter et al., 1999.) However, it is not clear whether these findings should be ascribed to toxic or mechanical damage, as a progressive effect is observed, which is proportionate to the length of contact of this substance with the retina (Velikay et al., 1993; Meller et al., 1998.)

Given the restricted use of PFCLs as long-term vitreous replacement - as a result of a quite intense compressive effect and of their arguable toxic effect - new products have been marketed with this objective. These are the most recent developments of perfluorocarbon liquids, known as "semifluorinated alkanes" (SFA), consisting of a combination of a perfluorocarbon and a hydrocarbon, which reduces the fluorinated portion of the molecular chain and has lesser density (Kirchhof, 1999; Singer, 1999.)

One of the SFAs used in ophthalmology is the perfluorohexyloctane (F_6H_8). Just like the other PFCLs, SFAs are optically clear, with a refractive index between 1.30 and 1.34, close to that of water (1.33), which is desirable to a substance that is intended to remain in the eye for a long time, until the retina is attached to its nourishing bed, causing a slight alteration to the ocular refractive index postoperatively. SFAs are soluble in PFCL, hydrocarbons and silicone oil (Langefeld et.al, 1999) and have low viscosity, exactly as PFCLs, therefore maintaining their characteristics, such as easy introduction into and removal from the eye by way of small cannulae, with a tendency towards dispersion into small bubbles. The SFAs are hydrophilic, have high interfacial tension and a large contact angle with the retina (Wong and Lois, 2000).

The lower specific gravity of F_6H_8 , when compared to other PFCLs, would allow its postoperative use as a tamponading agent, keeping the retina in the desired position, theoretically with fewer risks of cellular damage (Wong and Lois, 2000). Studies on perfluorohexyloctane as vitreous replacement in rabbit eyes did not show relevant retinal

changes on optical and electronic microscopy (Zeana et al., 2000) and the clinical experience with F_6H_8 , albeit limited, did not conclude that this substance leads to retinal damage (Kirchhof et al., 2002.) Despite these initial findings and due to the fact that F_6H_8 is a new product, investigation into the cytotoxicity of this compound is necessary in order to confirm its safety. In this sense, we assess the possible toxic effect of F_6H_8 under isolated and controlled conditions that only cell culture can offer. We compare the possible effects of F_6H_8 with a weight control, proportionally to the weight exerted on the cells, a cytotoxicity control and a treatment-free medium.

MATERIALS AND METHODS

Maintenance of cultured cells

In this study, we used Vero cells, a fibroblastic cell line established from the renal cells of the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*). These cells, obtained from the Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brazil), were maintained in Ham's F10 (Sigma) medium with 10% fetal calf serum (FCS, Nutricell) at 37° C. Regular media changes were performed when acidity achieved high levels, and repeaks were periodically made when there was confluence of the cell layer.

Perfluorohexyloctane (F_6H_8)

The perfluorohexyloctane (Geuder GmbH) used in this study has the following chemical and physical features: empirical and molecular formula $C_{14}F_{13}H_{17}$, short formula F_6H_8 , molecular weight 432, specific gravity 1.35 g/ml, surface tension of 21(mN/m), refractive index 1.34, viscosity 3.2 (centistoke, at 25°C) and boiling point of 223°C. Perfluorohexyloctane was slowly added to the culture medium to avoid "fish egging."

Indirect cytotoxicity test

F_6H_8 extracts were obtained in a concentration of 2g/ml in Ham's F-10 (Sigma) medium with 10% fetal calf serum (FCS) at 37°C for 48 hours, unshaken. After this period, the medium was harvested, and the F_6H_8 present in it was discarded. This way, it was possible to assess the potential effect of the substances released by F_6H_8 , which could be

present in the culture medium. The indirect cytotoxicity test and the extract obtention followed ISO-10993, 1992(E) international standards

Quantitative analysis of extracts on cell cultures

The method described by Murakami et al. (1998) was used for the quantitative analysis of the extracts on cell cultures. One hundred microliters of a Vero cell suspension containing 1.0×10^6 cells/ml in Ham's F10 medium with 10% fetal calf serum (FCS) were rapidly inoculated on a 96-well culture plate (Corning, Cambridge, MA, USA) and cultured for 12 hrs at 37°C. After the incubation period, the culture medium was removed and 100µl of a new medium containing F₆H₈ extracts were added to each well. After 12 hours of incubation at 37°C, the extracts were removed and the cells were washed in 0.1ml of phosphate-buffered saline (PBS) 0.1M, pH 7.4, at 37°C, fixed in 10% formalin for 15 minutes, washed in PBS for the same time period and stained with crystal violet 0.05% (in 20% methanol) for 15 minutes. The samples were washed twice in PBS for 30 minutes and embedded in sodium citrate at 0.1M (in 50% ethanol at pH 4.2) for the same time period. The plate with the remaining cells was read on a Multiskan Bichromatic Version 1.06 microplate reader in the 540-nm wavelength. An extract from the culture plate material (propylene) was used as negative control (no cytotoxic effect.) The total of samples was 16 in all experiments. The one-way ANOVA was used for statistical analysis, with a significance level of 0.05.

Direct Cytotoxicity Test

Direct cytotoxicity test consists in assessing the possible toxic effects of F₆H₈ in direct contact with Vero cell cultures. With this purpose, a 1-ml suspension of Vero cells in Ham's F10 medium with 10% fetal calf serum (FCS) containing 10^5 cells/ml was inoculated into each of the 24 well plates (Corning). The plates were incubated at 37°C for 12 hours. After the incubation period, 0.1ml of F₆H₈ was added on the cell layer. Glass slides were used as *weight control*, producing mechanical compression proportionate to the weight and area of 0.1ml of F₆H₈ used, which was inert in terms of toxicity. As *negative control*, we used the cells cultured in a treatment-free medium. As cytotoxicity positive control, we used silicone bands (Rhodiastic), with weight and area

proportionate to that of F_6H_8 . The samples were collected, fixed, and stained 12 hours after the addition of F_6H_8 , moment in which the findings were more significant, expressing the metabolic and structural changes of cells. The samples were then processed for immunocytochemical analysis.

Immunocytochemical analysis

The samples were collected after 12 hours of contact with F_6H_8 , or with their respective controls. After 12 hours of incubation, the culture medium was removed and the plates were washed with 0.9% saline in phosphate-buffered saline (PBS) at 37°C. The material was fixed in modified Karnovsky's solution (paraformaldehyde 4% / glutaraldehyde 0.2%, in phosphate-buffered saline 0.1M, pH 7.4) with Triton X100 at 0.2 % during 30 minutes, washed with PBS at 37°C and incubated with PBS containing bovine serum albumin (BSA, Sigma) at 1% during one hour at 4°C. The material was treated with primary anti-actin monoclonal antibody (Sigma, clone AL - 40, product code A-4.700, lot 0744826) diluted 1:200 and later on diluted 1:40 in PBS containing BSA at 1% during 18 hrs at 4°C in a moisture chamber. After being washed in PBS and BSA at 1%, the material was incubated for one hour with FITC-labeled antimouse IgG antibody (Sigma) as secondary antibody diluted 1:128 in PBS and BSA at 1%, washed with PBS and BSA, and mounted on a Vectashield plate and sealed with enamel. The analysis was made using inverted Olympus IX-50 microscope, and fluorescence filters, photographed with Kodak ISO 400.

Scanning electronic microscopy (SEM)

After being cultured under the same conditions previously described, the cells were fixed in 2.5% paraformaldehyde/glutaraldehyde (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) with phosphate buffer 0.1 M (pH 7.4) for two hours, then washed in phosphate buffer, followed by post-fixation with 1% osmium tetroxide (Sigma) for 15 minutes, and dehydrated in an ethanol series. After this procedure, the samples were critical point dried (Balzers CPDO030) and gold sputtered (Balzers 050.) The cells were analyzed on a scanning electronic microscope (model JEOL JSM-5800 LV.)

RESULTS

Indirect cytotoxicity test

The resultant reading did not show significant effects of F_6H_8 on cell growth in the different culture media. This way, our results indicate that F_6H_8 does not release any soluble toxic substance into the culture medium. These results can be seen in Figure 1.

Immunocytochemical analysis

The negative controls reveal cells forming a semiconfluent layer, with homogenously distributed actin filaments filling up the cytoplasm (Figure 2A). Figure 2B shows details of the previous figure. Figure 2C shows the cells 12 hours after the effect of glass slide weight with the same weight of F_6H_8 . Morphological changes to the cells were observed, with cytoplasmic retraction, formation of thin and long lengths and consequent accumulation of actin close to cell borders. Details of the previous sample are shown in Figure 2D. In cells under the toxic effect of silicone, irregular or fragmented morphology was observed, with cytoplasmic retraction and absence of cell lengths (Figure 2E.) When cultured in a medium in direct contact with F_6H_8 , the cells show abnormal morphology, sites with actin accumulation with streaklike distribution (Figures 2F and 2G.)

Scanning electronic microscopy

Semi-confluent cellular layer consisting of markedly flattened cells was observed on treatment-free glass slides. Some vesicles can be seen on the surface of the cells (Figures 3A and 3B.) Twelve hours after the effect of glass slide weight, which was equivalent to that of F_6H_8 , retracted cells with quite irregular morphology were observed, revealing thin and long lengths connecting one cell to the other (Figure 3C.) An increase in the number of vesicles and/or microvilli was noted on the cell surface (Figure 3D.) Cells cultured in a medium in direct contact with F_6H_8 showed cytoplasmic retraction and prominence of some cell lengths (Figures 3E and 3F.)

DISCUSSION

Perfluorocarbons have similar physical properties, such as high specific weight (heavier weight in relation to the same volume of water), and immiscibility with water and blood (Peyman *et al.*, 1995.) Some authors assessed the use of PFCLs as long-term vitreous replacements and concluded that, even when highly purified, they are toxic to the retina (Velikay *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1987; Eckardt *et al.*, 1991; Meller *et al.*, 1998). Conversely, other authors describe that the retention of a small volume of perfluorocarbon liquids in the vitreous cavity after surgery does not produce toxic response. Green *et al.* (1993,) Chang *et al.* (1991,) Peyman *et al.* (1995,) Stolba *et al.* (1997,) Liang and Peyman (1999) and Mertens *et al.* (2000) believe that cellular alterations result from a physical effect and that some occasional chemical toxicity may originate from impurities during product formulation. Due to the restricted use of PFCLs as long-term vitreous replacement, because of the intense compressive effect and of their arguable toxic effect, new products have been launched in the market, among which we have F₆H₈.

Cellular alterations under the effect of F₆H₈ were assessed in order to compare the structural findings produced by this SFA, acting directly on the cell layer as against the alterations provoked by a control, with proportional weight and area, and provably nontoxic to contact.

Although F₆H₈ was tested for toxicity under cell culture and did not show to inhibit cell proliferation (Meinert and Roy, 2000,) this product was not yet assessed using an inert compressive effect as parameter. This allowed a parallel analysis of the findings presented in the experiment. The investigation of cellular alterations under the effect of these substances is important, since we need a product that can remain in the eye for a longer period after the surgery, thus consolidating the result of a successful surgery, so that the retina remains reattached.

The indirect toxicity test clearly shows that F₆H₈ does not eliminate substances that could be deleterious to the cells. The findings are consistent with the data obtained by Meinert and Roy (2000) with different cell cultures. This way, we can conclusively

state that F_6H_8 does not produce indirect toxicity “in vitro”. The alterations are therefore contact-dependent and observed after some time of exposure. During this experiment, tests performed with shorter exposure of cells, with different weights, to the substances, showed less remarkable alterations, whereas longer exposure led to cell destruction, hampering any type of analysis (data not shown).

We observed that morphological changes shown by immunocytochemistry in the cells under the effect of F_6H_8 were similar to the damage caused by the weight control and significantly lower than those found in the cells grown in contact with the toxic effect of silicone. This suggests that F_6H_8 does not present direct toxicity.

Structural data could also be observed in detail on scanning electronic microscopy (SEM), on which the alterations were viewed with higher resolution. SEM revealed mild cytoplasmic retraction and an increase in the number of vesicles on the cell surface in the samples submitted to weight control. On the other hand, there was a slight reduction in the number and thickness of cell lengths under the effect of F_6H_8 . In both cases, irregular cells with lengths extending from the cytoplasm were found.

The joint analysis of the data obtained by way of direct and indirect cytotoxicity tests point to effects on cells limited only to the site of contact with F_6H_8 . The results accord with previous reports of experimental surgeries on animals, which showed alterations to the parts of the tissues in contact with the drug (Zeana *et al.*, 2000.)

Based on our results, it is possible to consider that the mechanical effect of F_6H_8 and of the equivalent weight exerted on the cellular layer caused some changes to its functions, impeding metabolic exchanges between cells and the culture medium. This condition was constant to all cells during the experiment. The fact that no remarkable differences were noted in the results suggests that F_6H_8 does not have a mechanism of action other than the compressive effect as far as the observed alterations are concerned. These data are in agreement with other previously published reports (Meinert and Roy 2000.)

Taken all together, these results can lead us to the interpretation that structural changes in the eyes caused by F_6H_8 after surgery in experimental animals originate mainly from the mechanical force exerted on the tissues in contact with the product and these changes are time-dependent. Therefore, there exists no probable toxic effect of

these substances when in contact with the cells, which is in agreement with the results published by Zeana *et al.* (2000.)

The efficiency of F_6H_8 as a tamponading agent to repair inferior retinal tears and to keep the retina attached to its original position still requires further investigation. The probable absence of toxicity and its lower weight suggest that it can be used as vitreous replacement, although possible secondary effects and precise length of use, without cellular changes, are yet to be defined.

REFERENCES

- Chang S. Low viscosity liquid Fluorochemicals in vitreous surgery. *Am. J. Ophthalmol.* **103**: 38-43, 1987.
- Chang S., Ozmert E., Zimmerman N. Intraoperative Perfluorocarbon Liquids in the Management of Proliferative Vitreoretinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* **106**: 668-674, 1988.
- Chang S., Reppucci V., Zimmerman N., Heinemann M., Coleman J. Perfluorocarbon liquids in the management of traumatic retinal detachments. *Ophthalmology*, **96**: 785-792, 1989.
- Chang S., Sparrow J. R., Iwamoto T., Gershbein A., Ross R., Ortiz R. Experimental studies of tolerance to intravitreal Perfluoro-N-octane liquid. *Retina*, **11**: 367-374, 1991.
- Eckardt C., Nicolai U., Winter M., Knop E. Experimental intraocular tolerance to liquid Perfluorooctane and Perfluoropolyether. *Retina*, **11**: 375-384, 1991.
- Estacia P., Santos Jr. A. R., Moreira L., Genari S. C. The cytotoxicity in Vero cells of perfluorocarbon used in vitreoretinal surgery. *Braz. J. morphol. Sci.* **19**: 41-47, 2002.
- Glaser M. B., Carter B. J., Kuppermann D. B., Michels G. R. Perfluorooctane in the treatment of giant retinal tears with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology*, **98**: 1613-1621, 1991.
- Green K., Slagle T., Chaknis M., Cheeks L., Chang S. Perfluorocarbon effects on rabbit blood-retinal barrier permeability. *Ophthalmic Res.*, **25**: 186-191, 1993.
- ISO 10993-1 Biological evaluation of medical devices- Part. 5.-Tests for cytotoxicity: "in vitro" methods. 1992.
- Kirchhof B. Fluorocarbons in Vitreoretinal Surgery. *Ophtalmo-Chirurgie*, **11**: 153-158, 1999.
- Kirchhof B., Wong D., Meurs J., Hilgers R., Macek M., Lois N., Schrage N. Use of Perfluorohexyloctane as long-term internal tamponade agent in complicated retinal detachment surgery. *Am J. Ophthalmol* **133**: 95-101, 2002.

- Langefeld S., Kirchhof B., Meinert H., Roy T., Aretz A., Schrage N. A new way of removing silicone oil from the surface of silicone intraocular lenses. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **237**: 201-206, 1999.
- Liang C. & Peyman G. Tolerance of extended term vitreous replacement with perfluoro-*n*-octane and perfluoroperhydrophenanthrene mixture (Phenotane). *Retina*, **19**: 230-237, 1999.
- Loewenstein A., Humayun M., De Juan Jr. E., Campochiaro P., Haller J. Perfluoroperhydrophenanthrene versus Perfluoro-*n*-octane in vitreoretinal surgery *Ophthalmology*, **107**: 1078-1082, 2000.
- Mathis A., Pagot V., Gazagne C., Malecaze F. Giant retinal tears. Surgical techniques and results using perfluorodecalin and silicone oil tamponade. *Retina*, **12**: S7-S10, 1992.
- Meinert H. & Roy T. Semifluorinated alkanes – A new class of compounds with outstanding properties for use in ophthalmology. *Eur. Ophthalmol.* **10**: 189-197, 2000.
- Meller D., Augustin A. J., Spitznas M., Lutz J., Meller K. Effect of different perfluorochemicals on dorsal root ganglion cells in vitro. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **236**: 182-187, 1998.
- Mertens S., Bednarz J., Richard G., Engelmann K. Effect of perfluorodecalin on human retinal pigment epithelium and human corneal endothelium in vitro. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **238**: 181-185, 2000.
- Moreira Jr. C., Uscocovich C., Moreira A. T. Experimental studies with Perfluorooctane for hemostasis during vitreoretinal surgery. *Retina*, **17**: 530-534, 1997.
- Murakami N., Fukuchi S., Takeuchi K., Hori, T., Shibamoto, S., Ito F. Antagonistic regulation of cell migration by epidermal growth factor and glucocorticoid in Human gastric carcinoma cells. *J. Cell Physiol.*, **176**: 127-137, 1998.
- Peyman G., Schulman J., Sullivan B. Perfluorocarbon Liquids in Ophthalmology. *Survey of Ophthalmology*, **39**: 375-395, 1995.
- Singer H. New studies further define role of PFCLs in vitreoretinal surgery. *Ocular Surgery News*, **17**: Febr. 50, 1999.

- Sparrow J., Jayakumar A., Berrocal M., Ozmert E., Chang S. Experimental studies of the combined use of vitreous substitutes of high and low specific gravity. *Retina*, **12**: 134-140, 1992.
- Stolba U., Krepler K., Pflug R., Velikay M., Wedrich A., Binder S. Experimental vitreous and aqueous replacement with perfluorophenanthrene. *Retina*, **17**: 146-153, 1997.
- Velikay M., Wedrich, A., Stolba U., Datlinger P., Li W., Binder S. Experimental long-term vitreous replacement with purified and nonpurified Perfluorodecalin. *American Journal of Ophthalmology*, **116**: 565-570, 1993.
- Winter M., Winter C., Wiechens B. Quantification of intraocular retained perfluorodecalin after macroscopic complete removal. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **237**: 153-156, 1999.
- Wong D., Lois N., Perfluorocarbons and Semifluorinated Alkanes. *Seminars in Ophthalmology*, **15**: 25-35, 2000
- Zeana D., Becker J., Kuckelkorn R., Kirchhof B. Perfluorohexyloctane as long-term vitreous tamponade in the experimental animal. *Int. Ophthalmol.* **2**: 17-24, 2000.

Legends to figures

Figure 1. Analysis of indirect cytotoxicity of F_6H_8 . The samples cultured with F_6H_8 extract were considered not significantly different (level of 0.05) from the controls (F_6H_8 : perfluorohexyloctane.)

Figure 2: Immunocytochemistry: Vero cells, cultured for 12 hours and incubated with anti-actin monoclonal antibody. **A)** and **B)** Negative control of the experiment (without treatment); **C)** and **D)** Cells 12 hours after the effect of glass slide weight with weight equivalent to that of F_6H_8 ; **E)** Cells under the toxic effect of silicone with weight equivalent to that of F_6H_8 ; **F)** and **G)** Cells under the compressive effect of F_6H_8 . Magnification bar = 50 μ m (**A**, **C**, and **F**) or 100 μ m (**B**, **D**, **E** and **G**.)

Figure 3: Scanning electronic microscopy of Vero cells submitted to different experimental conditions. **A)** and **B)** Negative control of the experiment (without treatment); **C)** and **D)** Cells 12 hours after the effect of glass slide weight with weight equivalent to that of F_6H_8 ; **E)** and **F)** Cells under the compressive effect of F_6H_8 .: Magnification bar = 5 μ m (**A**, **C** and **E**) or 50 μ m (**B**, **D** and **F**.)

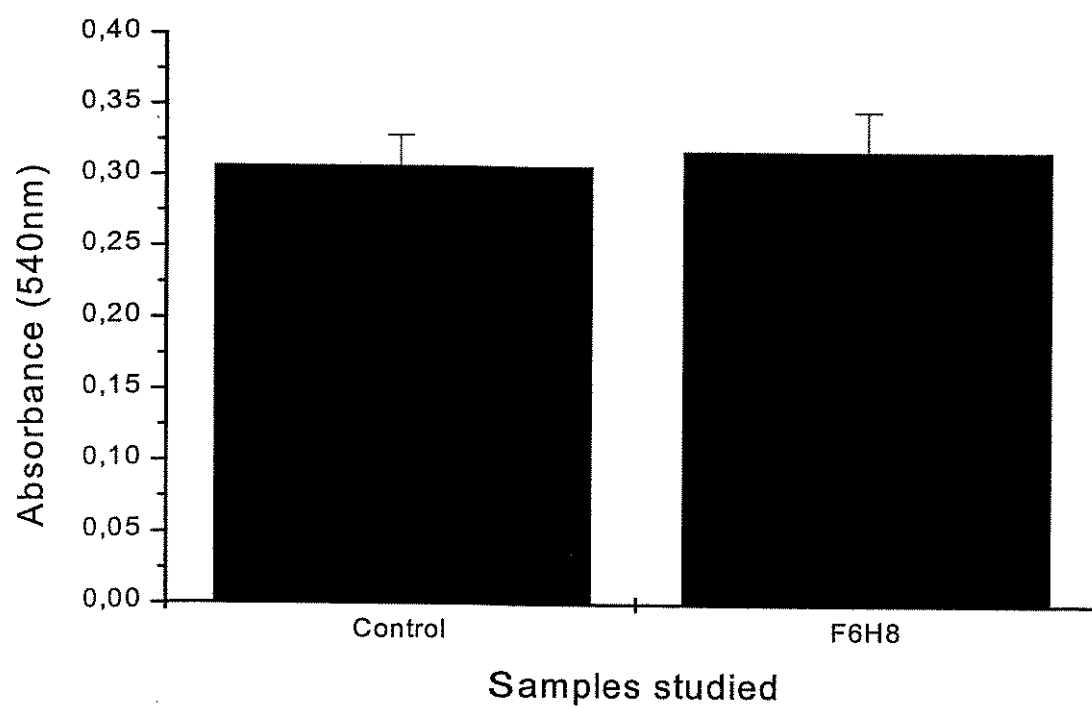
FIGURE 1

FIGURE 2

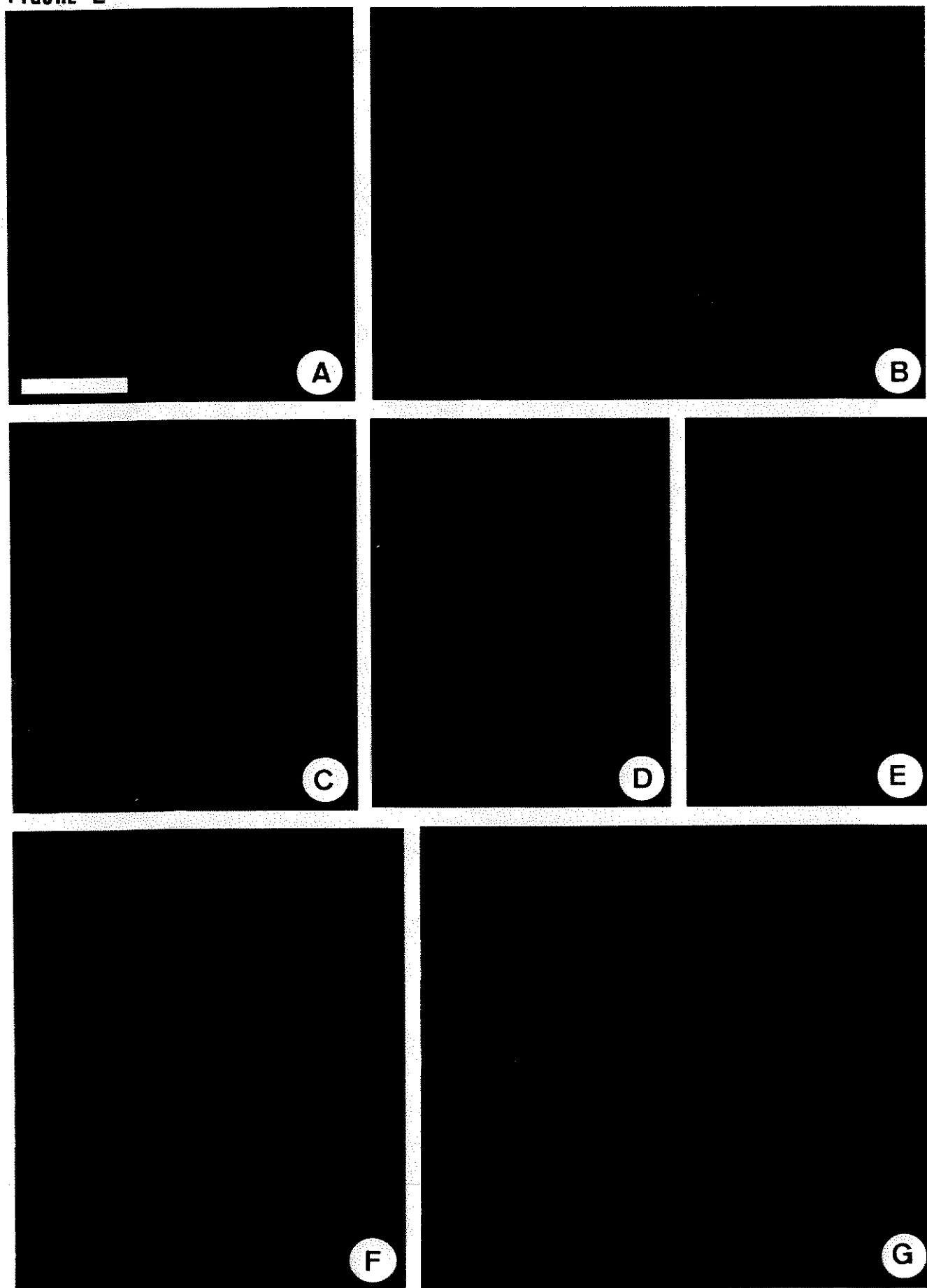
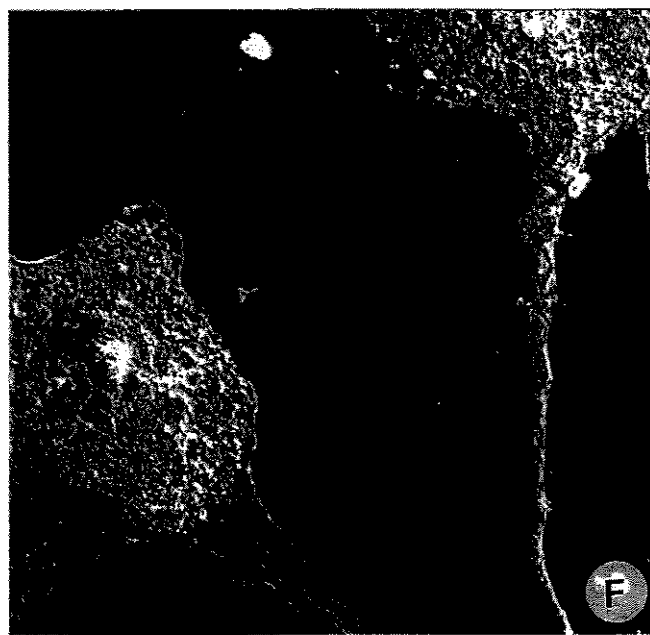
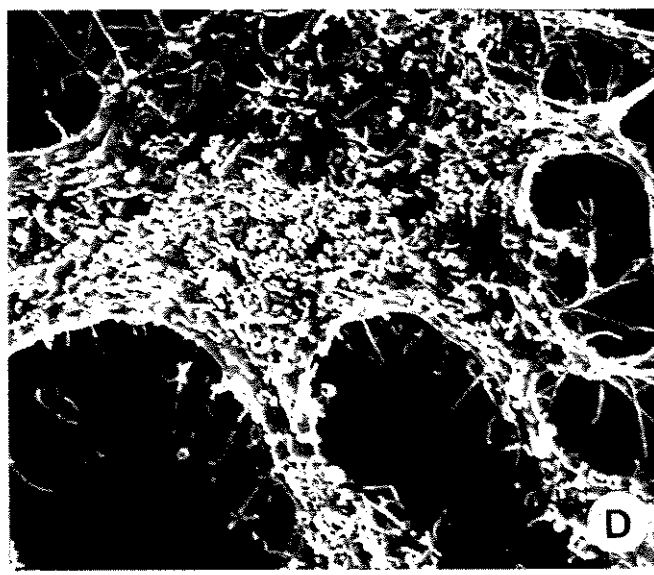
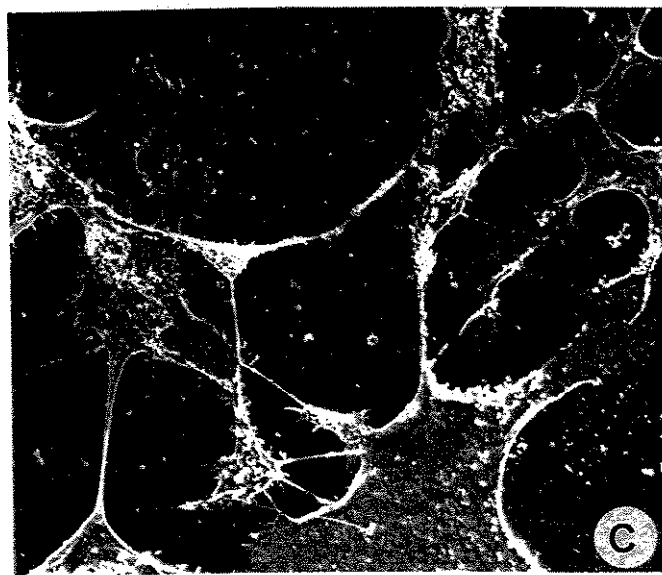
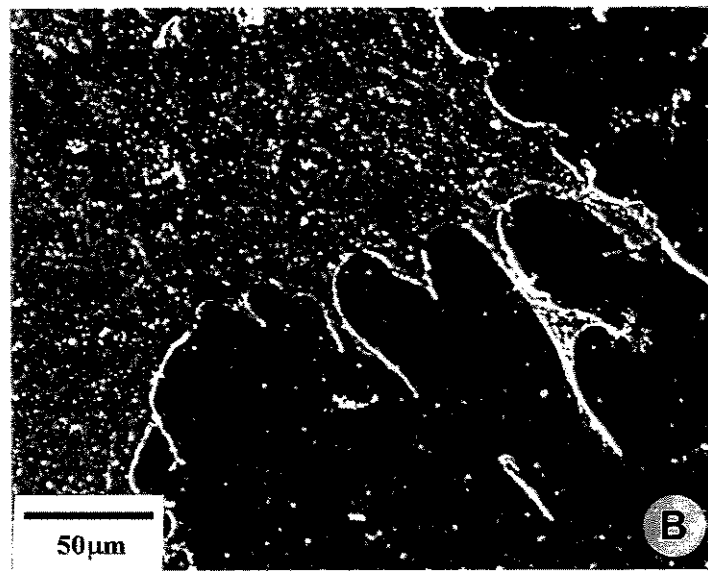
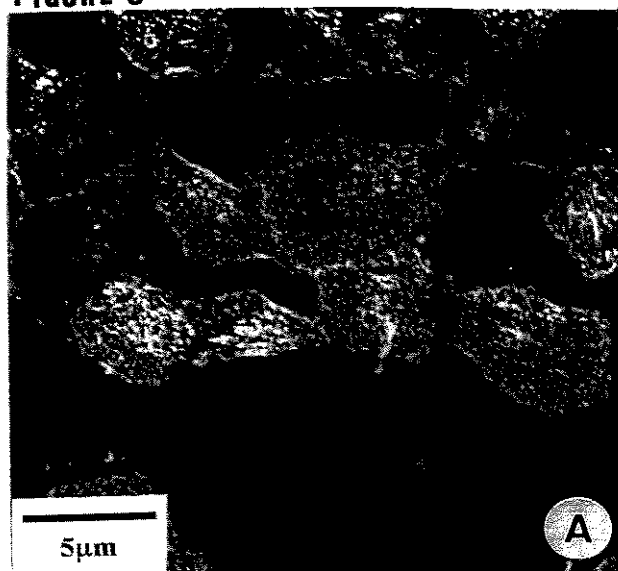


FIGURE 3

CAPÍTULO III

Avaliação do efeito do perfluorooctano e do perfluorohexilooctano utilizados em cirurgias oftalmológicas sobre cultura de células Vero

Paulo Estacia ^{1,2}; Arnaldo Rodrigues Santos Jr. ^{1,3}; Selma Candelária Genari ^{1,3}

1. Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, CP 6109, CEP 13084-971, FAX: 55.19.37886111.
2. Faculdade de Medicina, Universidade de Passo Fundo - UPF, Passo Fundo, RS, CEP 99100-000.
3. Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal – CREUPI, Espírito Santo do Pinhal, SP, CP 05, CEP 13990-000. Fax 55.19.6513579.

Running title: Effect of a perfluorooctane and a perfluorohexilooctane on Vero cells.

Requests and reprints to: Selma Candelária Genari, Dep. Cell Biology, Institute of Biology, State University of Campinas - UNICAMP. P.O. Box 6109, ZIP Code 13084-971, Campinas, São Paulo, Brazil. Fone/fax +55.19.37886111. E-mail: sgenari@nutricell.com.br

RESUMO

O perfluorooctano (PFOC) é um perfluorocarbono líquido (PFCL) utilizado em cirurgia oftalmológica como ferramenta intra-operatória. Entretanto, alguns autores afirmam que o PFOC pode causar reações tóxicas à retina. Como alternativa ao PFOC, foram desenvolvidos os alcanos semifluorinados, entre eles o perfluorohexilooctano (F_6H_8). Nesse sentido, avaliou-se, comparativamente, o possível efeito tóxico do PFOC e do F_6H_8 , em condições altamente controladas por meio de cultura celular. Foi feita a avaliação da citotoxicidade indireta, onde as células entram em contato apenas com elementos solúveis que possam ser eliminados pelo PFOC e F_6H_8 . Como resultado, observou-se que ambos os produtos não apresentam toxicidade indireta. Foi feita, então, a análise da possível toxicidade direta do PFOC e F_6H_8 , ou seja, toxicidade mediada pelo contato. Isso foi avaliado por citoquímica, microscopia eletrônica de varredura e a imunocitoquímica para actina. Utilizaram-se como controle células em meio de cultura livre de qualquer tratamento, um controle positivo para toxicidade (adesivos de silicone), que apresentam comprovado efeito tóxico, e um controle peso (lâminulas de vidro) que exercesse uma compressão mecânica similar ao PFOC ou F_6H_8 utilizado. Os ensaios de toxicidade direta mostraram que as alterações celulares promovidas pelo PFOC apresentavam características semelhantes às observadas pelos controles de toxicidade. Por outro lado, o F_6H_8 mostrou alterações similares daquelas promovidas pelo controle de peso e distintas do controle de toxicidade. Assim, concluiu-se que o PFOC apresenta efeito tóxico, ao passo que o F_6H_8 promove alterações proporcionais à compressão exercida sobre as células em cultura.

Palavras-chave: perfluorooctano, perfluorohexilooctano, cultura celular, toxicidade, oftalmologia.

ABSTRACT

Perfluorooctane (PFOC) is a perfluorocarbon liquid used in eye surgeries as an intraoperative tool. Nevertheless, some authors declare that PFOC may cause toxic reactions to the retina. As an alternative to PFOC, semifluorinated alkanes, such as perfluorohexyloctane (F_6H_8), were developed. Therefore, we comparatively assessed the potential toxic effect of PFOC and F_6H_8 under highly controlled cell culture conditions. We analyzed indirect cytotoxicity, where the cells only come into contact with soluble elements that can be eliminated by PFOC and F_6H_8 . We observed, however, that both products do not present indirect toxicity. We therefore analyzed direct toxicity (contact toxicity) of PFOC and F_6H_8 by means of cytochemistry, scanning electronic microscopy and immunocytochemistry reagents for actin. Cells embedded in a treatment-free culture medium were used as control – a positive control for toxicity (silicone bands), with an undeniably toxic effect on cells, and a weight control (glass slides) that produced a mechanical compression similar to the amount of PFOC or F_6H_8 used in the experiment. Our direct toxicity tests showed that cellular alterations caused by PFOC were similar to those produced by toxicity control. On the other hand, F_6H_8 revealed alterations that were similar to those triggered by the weight control and different from those of toxicity control. Our conclusion is that PFOC has a toxic effect, whereas F_6H_8 causes alterations that are proportional to the compression exerted on cultured cells.

Key words: perfluorooctane, perfluorohexyloctane, cell culture, toxicity, ophthalmology.

INTRODUÇÃO

O uso há alguns anos, na oftalmologia, dos perfluorocarbonos líquidos (PFCLs) e, mais recentemente, a introdução dos alcanos semifluorinados (ASFs) proporcionaram um grande avanço na cirurgia vítreo retiniana, o que permitiu a ampla substituição do gel vítreo e propiciou uma melhor manipulação da retina. O seu uso facilita a cirurgia numa ampla variedade de condições, reposicionando a retina na sua posição anatômica com maior segurança e com menor trauma aos tecidos intra-oculares (Glaser *et al.*, 1991; Peyman *et al.*, 1995). São utilizados em várias situações, como nos casos complicados de descolamento de retina (Chang *et al.*, 1989), vitreorretinopatia diabética (Chang *et al.*, 1988), controle de hemorragias vítreas transoperatórias (Moreira Jr *et al.*, 1997) e quando lentes intra-oculares ou o próprio cristalino são deslocados para o vítreo.

Perfluorocarbonos líquidos são compostos sintéticos com ligações fluor-carbono. Entre os mais usados em oftalmologia estão o perfluorotano, o perfluorodecalin e a perfluorotributilamina. Os diferentes PFCLs são eficientes para reaplicar a retina (Sparrow *et al.*, 1992) e apresentam propriedades físicas similares entre si, como um alto peso específico (maior peso em relação ao mesmo volume), imiscibilidade com a água e sangue (Peyman *et al.*, 1995) e baixa viscosidade (Chang *et al.*, 1989) embora isso aumente sua tendência de se dispersar em bolhas menores (Wong and Lois, 2000). Também não são alterados quando necessário tratamento com laser intra-ocular (Meinert *et al.*, 1995).

Os dados da literatura são controversos quanto à toxicidade dos perfluorocarbonos (PFC). Alguns autores dizem que não há toxicidade direta causada por seus constituintes, que as alterações celulares encontradas seriam decorrentes de um efeito físico e que uma eventual toxicidade química seria consequência de impurezas, como compostos com ligações nitrogênio, compostos contendo hidrogênio e ligações insaturadas de carbono (Green *et al.*, 1993; Peyman *et al.*, 1995; Stolba *et al.*, 1997; Liang and Peyman, 1999; Mertens *et al.*, 2000).

Outros relatos afirmam que os PFCLs deixados nos olhos dos pacientes após a cirurgia para atuarem como agentes tamponantes podem causar reações inflamatórias e danos celulares, como compressão e destruição da arquitetura normal da retina, com sua desorganização, alterações degenerativas dos fotorreceptores, ativação dos macrófagos na

retina e redução no número de células (Chang *et al.*, 1991; Meller *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 1999).

Mesmo *in vitro*, os dados em relação à possível toxicidade do PFOC são controversos. Mertens *et al.* (2000), avaliando a capacidade proliferativa e a vitalidade de culturas de células do epitélio pigmentar incubadas com um PFCL, o perfluorodecalin, concluem que o dano celular não seria de uma toxicidade direta sobre as células, mas, sim, um efeito mecânico ou indireto no metabolismo celular, impedindo as trocas metabólicas normais entre as células e o meio. Por outro lado, Meller *et al.* (1998), avaliando a possível toxicidade de dois PFCLs, o perfluorodecalin e o perfluorooctano, em cultura de células glanglionais nervosas pressupõem que as alterações celulares encontradas seriam decorrentes de outros mecanismos fisiopatológicos que não apenas puras alterações mecânicas.

Na tentativa de se solucionar estes inconvenientes - o efeito compressivo muito intenso e o discutível efeito tóxico -, foram desenvolvidos os alcanos semifluorinados (ASF) como indicação de substituto vítreo de longo prazo. Os ASF consistem da união de um hidrogencarbono com um perfluorocarbono, o que diminui a parte fluorinada na cadeia molecular levando a uma menor densidade. O seu menor peso específico em relação aos outros PFCLs indicaria seu uso como substituto vítreo de longo prazo (Kirchhof, 1999; Singer, 1999).

Um dos ASF de uso oftalmológico desenvolvidos é o perfluorohexilooctano (F_6H_8). Como os outros PFCLs, os SFAs são lípidos, têm menor gravidade específica, quando comparados com outros PFCLs, apresentando índice de refração que varia entre 1.30 a 1.34, portanto próximo ao da água (1.33), característica importante a uma substância que deve ficar um maior tempo no olho, até que aconteça uma união estável da retina na coróide, pois acarretaria uma mínima alteração do poder de refração ocular pós-operatório. Essas características do F_6H_8 possibilitariam o seu uso pós-operatório, mantendo a retina na posição desejada, teoricamente com menor risco de dano celular (Wong and Lois, 2000). Os SFA são solúveis em PFCL, hidrocarbonos e óleo de silicone e têm baixa viscosidade como os PFCL, mantendo as qualidades que caracterizam estes últimos como bons agentes adjuvantes na cirurgia de vítreo-retina. A característica dos SFA de serem solúveis em óleo de silicone faz dessas substâncias os primeiros solventes biocompatíveis para o óleo de

silicone, o que tem permitido seu uso em cirurgias para remoção deste óleo da superfície das lentes intra-oculares quando necessário (Langefeld *et al.*, 1999).

A experiência clínica com o F_6H_8 ainda é limitada, mas estudos experimentais em coelhos, como substituto do vítreo por períodos de até nove semanas, não mostraram alterações retinianas importantes na microscopia ótica e eletrônica (Zeana *et al.*, 2000), nem concluíram que este levasse a dano retiniano (Kirchhof *et al.*, 2002). Embora o PFOC seja o produto mais amplamente utilizado, nossos dados anteriores reforçam a sua limitação para uso por tempos prolongados (Estacia *et al.*, 2002) e, uma vez que o F_6H_8 vem se mostrando como uma opção promissora em cirurgias de vítreo-retina, este trabalho propõe-se avaliar de forma integrada e comparativa os efeitos dessa nova substância em relação ao PFOC. O objetivo é determinar a possibilidade dessas substâncias em permanecer em contato com células em cultura e avaliar o dano potencial que possa ser causado por elas. Assim, compararam-se os possíveis efeitos do F_6H_8 e do PFOC com um controle de peso proporcional ao exercido por essas duas substâncias sobre as células, utilizando-se um controle de toxicidade e uma situação onde as células cresceram livres de qualquer tratamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Manutenção das células em cultura

Neste trabalho foram utilizadas células Vero, uma linhagem celular fibroblástica estabelecida a partir de células renais do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Estas células são provenientes do Instituto Adolfo Lutz, SP, e foram mantidas em meio Ham-F10 (Sigma) com 10% de soro fetal bovino (SFB, Nutricell) a 37 °C. As trocas de meio foram feitas sempre que ocorria acidificação do mesmo, e os repiques foram periodicamente efetuados à medida que ocorria a confluência do tapete celular.

Perfluorooctano (PFOC) e perfluorohexyloctane (F_6H_8)

O PFOC (Ophthalmos Ltda.) utilizado apresenta as seguintes características físicas e químicas: fórmula molecular empírica C_8F_{18} , peso molecular 438, gravidade específica 1,76 g/ml, tensão superficial de 14 (mN/m), índice de refração 1,27, viscosidade 0,8 (centistoke, a 25 °C) e com 100% de pureza. O perfluorohexyloctane (Geuder GmbH) utilizado neste

estudo apresenta as seguintes características físicas e químicas: fórmula molecular empírica $C_{14}F_{13}H_{17}$, fórmula molecular resumida F_6H_8 , peso molecular 432, gravidade específica 1,35 g/ml, tensão superficial de 21(mN/m), índice de refração 1,34, viscosidade 3,2 (centistoke, a 25 °C) e ponto de ebulição de 223 °C. Com ambos os produtos, foi tomado o cuidado de adicioná-los ao meio de cultura de forma lenta, evitando, assim, formação de pequenas bolhas.

Teste de Citotoxicidade Indireta

Extratos de PFOC ou F_6H_8 foram obtidos colocando-se esses materiais na concentração de 2g/ml de meio Ham F-10 (Sigma) com 10% SFB a 37 °C por 48 horas, sem agitação. Depois de transcorrido esse período, o meio foi recolhido e o PFOC ou F_6H_8 nele presente foi descartado. Dessa forma pôde ser avaliado o possível efeito de substâncias liberadas pelo PFOC ou F_6H_8 que poderiam estar presentes no meio de cultura. O teste de citotoxicidade indireta e obtenção dos extratos foi delineado de acordo com recomendações internacionais (ISO-10993, 1992(E); Kirkpatrick, 1992).

Análise quantitativa dos extratos sobre as culturas celulares

Para a análise quantitativa dos extratos sobre as culturas celulares utilizou-se o método descrito por Murakami *et al.* (1998). Resumidamente, 100µl de uma suspensão de células Vero contendo 10^6 células/ml em meio Ham-F10 com 10% de SFB foram inoculados em uma placa de cultura com 96 poços (Corning, Cambridge, MA, USA) e cultivadas por 12h nessas condições a 37 °C. Após esse período de incubação, o meio de cultivo foi removido e foram adicionados a cada poço 100µl de meio novo com os extratos de PFOC ou F_6H_8 . Após 12 horas de incubação a 37 °C os extratos foram removidos e as células foram lavadas com 0,1ml de tampão fosfato salino 0,1M (PBS) em pH 7,4 a 37 °C, fixadas em formalina 10% por 15 minutos, lavadas em PBS pelo mesmo tempo e coradas por cristal violeta 0,05% (em metanol 20%) por 15 minutos. As amostras foram, então, lavadas duas vezes com PBS por 30 minutos e incubadas com citrato de sódio a 0,1M (em etanol 50% com pH 4,2) pelo mesmo período. A placa com as células remanescentes foi, então, lida em um leitor de microplacas Multiskan Bichromatic Versão 1.06, no comprimento de onda de 540 nanômetros. Foi usado como controle positivo, ou seja, sem

efeito citotóxico, um extrato do material da própria placa de cultura (polipropileno). Todos os experimentos utilizaram $n=16$. Para análise estatística foi efetuada a análise da variância dos resultados obtidos (One-Way ANOVA) com nível de significância de 0,05.

Teste de Citotoxicidade Direta

A análise de citotoxicidade direta consiste na avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do PFOC ou F_6H_8 em contato direto com as culturas de células Vero. Com esse objetivo, 1ml de suspensão de células Vero em meio Ham-F10 com 10% de SFB contendo 10^5 células/ml foi inoculado em cada poço de placas de cultura de células com 24 poços (Corning). As placas foram incubadas a 37 °C por 12 horas. Após esse período de incubação, 0,1ml de PFOC ou F_6H_8 foi adicionado sobre o tapete celular. Como *controle de peso*, foram utilizadas lamínulas de vidro, fazendo a compressão mecânica proporcional ao peso e área dos 0,1ml de PFOC ou F_6H_8 utilizado, porém inertes no que tange à toxicidade. Como *controle negativo* utilizaram-se as células cultivadas em meio de cultura na ausência de qualquer outro tratamento. Como *controle positivo* de citotoxicidade, utilizaram-se adesivos de silicone (Rhodiastic), com peso e área proporcional à ocupada pelo PFOC ou F_6H_8 .

Foram utilizadas placas de 24 poços, cada uma apresentando compartimentos usados para o controle negativo, para o PFOC ou F_6H_8 , controle de peso, controle positivo. As amostras foram processadas após um período de doze horas da adição de PFOC ou F_6H_8 , momento em que os achados foram mais significativos e expressivos das transformações metabólicas e estruturais das células, sob o efeito dos produtos e respectivos controles. Testes realizados com tempos de contato mais curtos entre as células com os diferentes pesos e as substâncias mostraram alterações menos marcadas, ao passo que tempos de contato maior levaram à destruição celular que impedia qualquer análise. As células de todas as amostras foram analisadas sob o aspecto citoquímico e imunocitoquímico e morfológico. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

Análise citoquímica

Uma parte do material separado para análise citoquímica foi fixada em etanol/ácido acético 3:1 (v/v). A análise foi realizada através da coloração com azul de toluidina em pH

4,0 (0,025 % em tampão MacIlvaine pH 4,0). O material foi corado por 15 minutos, lavado por passagem rápida em água, deixado secar ao ar, diafanizado por imersão em xilol por 10 minutos e, a seguir, montado com Entelan. Esse corante se presta à detecção de radicais aniônicos presentes nas células. O restante das amostras foi fixado com formalina (10%) e corado com Xilidine Ponceau em pH 2,5 para detecção de radicais catiônicos também encontrados nas células.

Análise Imunocitoquímica

As amostras foram colhidas após 12h de contato com o PFOC ou F_6H_8 , ou com seus respectivos controles. Após 12 h de incubação, o meio de cultivo foi retirado e as placas foram lavadas com salina 0,9% em tampão fosfato (PBS) a 37 °C. O material foi fixado em solução de Karnovsky (paraformaldeído 4% / glutaraldeído 0,2%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4) com Triton X100 a 0,2 % durante 30 minutos, lavado com PBS a 37 °C e incubado com PBS mais albumina sérica bovina - (BSA, Sigma) a 1% durante uma hora a 4 °C. O material foi tratado com anticorpo monoclonal primário antiactina (Sigma, clone AL - 40, prod. número A-4.700, Lote 0744826) diluído 1:200 e, após, diluído 1:40 em PBS contendo BSA a 1% durante 18 h a 4 °C em câmara úmida. Após lavagem com PBS mais BSA a 1%, o material foi incubado por uma hora com anticorpo secundário antimouse IgG conjugado com FITC (Sigma) diluído 1:128 em PBS mais BSA a 1%, lavado com PBS mais BSA e montado em lâmina com Vectashield e vedação com esmalte. A observação foi efetuada em microscópio invertido Olympus IX-50 usando filtros para fluorescência e fotografado com filme Kodak ISO 400.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O procedimento básico de ensaio em microscopia eletrônico, com as condições de cultura e controles utilizados, foi o mesmo descrito anteriormente. As células foram fixadas em Paraformaldeído 4%/Glutaraldeído 2,5% (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 por duas horas; então foram lavadas em tampão fosfato, pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% (Sigma) por 15 minutos e desidratado em uma série de etanol. Após esse procedimento, as amostras foram desidratadas em *ponto crítico* (Balzers

CPDO030) e recobertas com ouro em *sputter* (Balzers 050). As células foram observadas com um microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM-5800 LV.

RESULTADOS

Teste de citotoxicidade indireta

O resultado da leitura da placa não mostrou diferenças significativas do PFOC ou do F_6H_8 sobre o crescimento celular nas diferentes condições de cultura empregadas. Dessa forma, nossos resultados indicam que esses materiais não liberam nenhuma substância tóxica solúvel para o meio de cultura. Esses resultados podem ser observados na Figura 1.

Análise citoquímica com azul de toluidina pH 4,0 (AT)

Nas células que cresceram sem qualquer tratamento (controle negativo do experimento) encontrou-se um tapete celular semiconfluente com células cultivadas sem a ação de efeito químico ou mecânico. Observaram-se células com citoplasma e núcleo levemente metacromático com cromatina descondensada, nucléolos pouco evidentes (Figura 2A e 3A).

Após 12 horas do efeito do peso das lamínulas com equivalência ao peso e área do F_6H_8 , observou-se a diminuição no número de células presentes. As células remanescentes apresentavam os núcleos com uma metacromasia mais intensa e retração citoplasmática. Essas alterações foram mais intensas no peso proporcional ao PFOC (Figura 2B) que ao F_6H_8 (Figura 3B). As células que cresceram sob a ação tóxica do silicone com peso e área equivalente ao do PFOC ou F_6H_8 estavam em menor número. Encontraram-se ainda sinais de degeneração celular com condensação nuclear e citoplasmática, com grande basofilia metacromática na maioria das células encontradas, além de aglomeração das células presentes (Figuras 2C e 3C). Nas células cultivadas em meio de cultura com extratos de PFOC ou F_6H_8 (sem contato direto) não se observaram as alterações celulares. Os resultados foram muito semelhantes aos descrito no controle inicial do experimento (Figuras 2D e 3D). Nas amostras que cresceram em contato direto com o PFOC, observaram-se células com retração citoplasmática e, em alguns casos, fragmentação do citoplasma. Observaram-se os núcleos ainda com uma basofilia ligeiramente aumentada

(Figura 2E). Nos experimentos onde as células cresceram em contato direto com o F_6H_8 , havia uma discreta redução no número de células, com citoplasma e núcleo levemente metacromáticos e nucléolos evidentes. Algumas células em divisão puderam ser encontradas (Figura 3E).

Análise citoquímica com Xilidine Ponceau pH 2,5 (XP)

Nas células que cresceram sem qualquer tratamento (controle negativo do experimento) encontrou-se um tapete celular semiconfluyente com acidofilia citoplasmática e nuclear. O nucléolo mostrou-se intensamente acidófilo em relação às demais estruturas celulares (Figura 4A e 5A).

Após 12 horas do efeito do peso das lamínulas com equivalência ao peso e área de PFOC ou F_6H_8 , foram observados, além da diminuição do número de células, intensa acidofilia, vacuolização citoplasmática evidente e nucléolos intensamente corados (Figura 4B e 5B). Sob a ação tóxica do silicone com peso e área equivalente ao PFOC ou F_6H_8 , encontrou-se uma redução mais acentuada no número de células e sinais de degeneração celular, condensação ou vacuolização citoplasmática e grande acidofilia do núcleo e nucléolo (Figura 4C e 5C). Nas células cultivadas em meio de cultura com extratos de PFOC ou F_6H_8 (sem contato direto) observou-se um padrão citoquímico muito semelhante ao apresentado nas células que cresceram sem qualquer tratamento (Figura 4D e 5D). Nas células sob o efeito do PFOC, observou-se uma drástica redução do número de células, e as que podiam ser encontradas apresentavam uma intensa retração nuclear e citoplasmática, mostrando-se intensamente acidófilas (Figura 4E). Nas células sob o efeito do F_6H_8 encontrou-se uma pequena acidofilia citoplasmática e nuclear, porém os nucléolos mostravam-se bem corados. Células com morfologia irregular, vacuolização ou fragmentação citoplasmática puderam ser encontradas (Figura 5E).

Análise Imunocitoquímica

As células que cresceram livres de qualquer tratamento (controle negativo) apresentaram-se como um tapete semiconfluyente onde as células individualmente se mostravam com morfologia irregular e com os filamentos de actina homogeneamente distribuídos e ocupando todo o citoplasma (Figura 6A). Na presença de silicone

proporcional ao peso e área do PFOC ou F_6H_8 , a visualização dos filamentos de actina tornou-se prejudicada, passando a ser visualizado apenas uma marcação homogênea pelo citoplasma. As células apresentavam-se retraídas e, por vezes, fragmentadas (Figura 6B e D). Nas células que cresceram em contato com o PFOC observou-se que, onde acontecia o contato direto das células com o perfluorocarbono, ocorria a morte destas e podiam ser vistos apenas fragmentos celulares, conforme visualizado na região de transição entre a área de contato do PFOC com a camada celular (Figura 6C). Quando cultivadas em meio de cultura em contato direto com o F_6H_8 , as células mostravam regiões de acúmulo de actina com distribuição pontual ou homogeneamente distribuído pelo citoplasma (Figura 6E). Não se observou a presença dos filamentos de actina individualizados no citoplasma nas amostras tratadas com o PFOC ou F_6H_8 .

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Nas células que cresceram sobre as laminulas de vidro sem qualquer tratamento observou-se tapete semiconfluyente composto por células bastante achatadas. Algumas microvilosidades e/ou vesículas podiam ser observadas na superfície dessas células (Figura 7A). Após 12 horas do efeito compressivo equivalente ao peso e área do PFOC observou-se uma forte retração citoplasmática nas células. Foram encontrados ainda alguns finos prolongamentos ligando as células ao substrato, assim como algumas projeções citoplasmáticas (Figura 7B). Em contato direto com o PFOC encontrou-se um escasso número de células. As que se mostravam presentes apresentavam-se bastante retraídas, sem projeções ou prolongamentos citoplasmáticos, mas com algumas vesículas e/ou microvilosidades em sua superfície (Figura 7C).

Nas amostras submetidas ao efeito compressivo equivalente ao peso e área do F_6H_8 , visualizaram-se células retraídas, com morfologia bastante irregular, apresentando prolongamentos finos e longos conectando uma célula a outra. Algumas vesículas e/ou microvilosidades na superfície das células também puderam ser encontradas (Figura 7D). Em contato direto com o F_6H_8 , encontrou-se maior número de células se comparado ao tratamento direto com o PFOC. Observaram-se, ainda, retração citoplasmática e projeções de alguns prolongamentos celulares, com um grande número de vesículas e/ou microvilosidades presentes na superfície celular (Figura 7E).

DISCUSSÃO

A maior gravidade específica do PFOC e do F_6H_8 promove uma estabilização hidrocínética da retina durante a cirurgia, deslocando o líquido sub-retiniano (Mertens *et al.*, 2000). Essas substâncias também têm o objetivo de servir não apenas como ferramenta intra-operatória, mas também se estuda seu uso como agentes tamponantes intra-oculares, que, inseridos durante o ato cirúrgico para posicionar a retina, permaneçam o tempo pós-operatório necessário até que se desenvolva uma adesão retiniana que impeça seu redescolamento. Embora o PFOC seja uma boa ferramenta transoperatória, seu uso nos olhos após a cirurgia não foi bem tolerado por sua excessiva pressão mecânica sobre as células e seu discutível efeito tóxico (Chang *et al.*, 1991; Velikay *et al.*, 1993; Meller *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 1999) além de complicações advindas do maior tempo de contato com as estruturas intra-oculares, como inflamação, aumento da pressão intra-ocular, edema de córnea (Stolba *et al.*, 1999) e dano estrutural à retina (Stolba *et al.*, 1997). Daí o interesse no F_6H_8 em relação a sua utilização como possível substituto vítreo de longo prazo. Como essas substâncias vão ficar no olho um tempo maior, a avaliação de sua toxicidade é fundamental.

O teste de citotoxicidade indireta mostra que o PFOC ou o F_6H_8 não eliminam substâncias que possam ser deletérias à célula. Assim, os dados apontam para a conclusão de que o PFOC e o F_6H_8 não apresentam toxicidade indireta, ou seja, não promovem alterações celulares por meio de produtos solúveis eliminados por eles. As alterações observadas em outros estudos seriam, então, dependentes do contato com os referidos materiais e observadas após um determinado período de exposição. Esses resultados estão em acordo com outros trabalhos previamente publicados tanto para o PFOC (Stolba *et al.*, 1999; Estacia *et al.*, 2002) como para o F_6H_8 (Meinert and Roy, 2000) com diferentes tipos de células em cultura.

Em relação à avaliação da toxicidade direta, aquele dependente de contato com a substância estudada, dados citoquímicos têm muito a informar. Quando cultivadas livres de qualquer tratamento, as células apresentavam-se homogeneamente distribuídas, com morfologia irregular e bem coradas, tanto pelo AT quanto pelo XP. O AT é um corante

aniônico que, em pH 4,0, cora glicosaminoglicanos, DNA e RNA (Lison, 1960; Módis, 1991; Mello, 1997). As células Vero não são uma linhagem celular que acumula glicosaminoglicanos em seu citoplasma; portanto, a basofilia encontrada pode ser atribuída ao acúmulo de ácidos nucléicos. A metacromasia citoplasmática deve representar RNA, provavelmente rRNA, o que indica um retículo endoplasmático rugoso abundante e, conseqüentemente, uma intensa síntese de proteínas. O XP é um corante catiônico que evidencia, em pH 2,5, as proteínas totais presentes nas células (Lison, 1960). A acidofilia observada pelas células coradas com o XP indica uma riqueza de proteínas citoplasmáticas, corroborando com os dados obtidos com o AT. Assim, os dados citoquímicos indicam que as células cultivadas em condições controle apresentam uma grande atividade metabólica.

A alteração no padrão cromático observada pelo AT ou XP nas células, quando tratadas com o silicone ou peso, indicam a diminuição do conteúdo total de RNA/proteínas no citoplasma, seja por redução desses componentes, seja pela sua concentração em conseqüência da retração citoplasmática observada. No caso das amostras em contato com o silicone, observou-se ainda, o agrupamento de células com características degenerativas. Quando as células cresceram em contato apenas com os extratos do PFOC ou F_6H_8 , não se pôde observar qualquer alteração se comparadas ao controle, reforçando as conclusões de que tanto o PFOC quanto o F_6H_8 não apresentam toxicidade indireta. Quando as células cresceram em contato direto com o PFOC, observou-se um padrão citoquímico semelhante ao observado pela ação tóxica exercida pelo silicone. Por outro lado, nas células que cresceram em contato direto com o F_6H_8 , o padrão citoquímico encontrado assemelha-se mais ao observado nas células submetidas à compressão mecânica. Assim, se os dados citoquímicos sugerem atividade tóxica exercida pelo PFOC, isso não ocorre em relação ao F_6H_8 .

Green *et al.* (1993), em experimentos com coelhos, observaram que a retenção de até 25% do volume da cavidade vítrea com o PFOC não evidenciava toxicidade em períodos de observação de até sete semanas. Eckardt *et al.* (1991), avaliando de maneira experimental a tolerância intra-ocular para dois PFCLs, concluíram que os achados histológicos encontrados na retina inferior, que foi a parte do tapete retiniano que esteve em contato com os dois produtos, são de natureza tóxica. Também outros autores, em estudos experimentais, avaliando o uso de outros PFCLs como substitutos vítreos de longo prazo,

concluíram que mesmo estando altamente purificados, eles são tóxicos à retina. (Velikay *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1987).

Danos estruturais semelhantes ao descritos na citoquímica foram também encontrados em microscopia eletrônica de varredura, onde as alterações foram visualizadas com maior clareza. A MEV mostrou retração citoplasmática e a disposição de vesículas e/ou microvilosidades na superfície das células submetidas ao controle peso proporcional às duas substâncias. Em ambos os casos, foram encontradas células irregulares, com projeções citoplasmáticas e pequenos prolongamentos partindo do citoplasma.

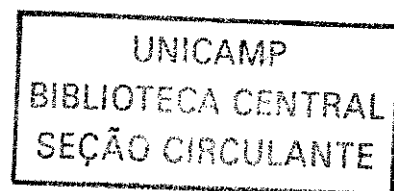
Nas amostras que se mantiveram em contato direto com o PFOC, observou-se uma grande redução no número de células; as que se mostravam presentes apresentavam-se bastante retraídas e com poucas projeções citoplasmáticas. Esses dados são semelhantes aos descritos por nós anteriormente (Estacia *et al.*, 2002), confirmando as alterações estruturais promovidas pelo PFOC. Por outro lado, nas células que cresceram sob F_6H_8 , ocorreu uma discreta diminuição no número e na espessura dos prolongamentos citoplasmáticos. Além, disso, as células incubadas com o F_6H_8 podiam ser encontradas em maior número e também mostravam maior número de pequenos prolongamentos celulares quando comparadas com o PFOC. Esses dados indicam um dano celular menos intenso do F_6H_8 que o ocasionado pelo PFOC.

A imunocitoquímica nas células submetidas às diferentes condições experimentais também evidenciaram alterações mais intensas nas células que cresceram em contato com o PFOC que sobre o F_6H_8 . Mostraram também que as modificações promovidas pelo F_6H_8 são distintas daquelas encontradas nas células submetidas ao efeito tóxico do silicone.

Analisados em conjunto, os resultados apontam para a interpretação de que as alterações estruturais provocadas pelo F_6H_8 em olhos após cirurgias em animais de experimentação seriam, sobretudo, em decorrência da força mecânica do mesmo, conforme sugerido por Zeana *et al.*, (2000). Por outro lado, o PFOC parece apresentar atividade tóxica dependente de contato, conforme sugerido por Stolba *et al.* (1999) e Mertens *et al.* (2000).

O óleo de silicone é o substituto vítreo utilizado atualmente por períodos de tempo mais longos, mas existe uma série de limitações ao seu uso, como a menor eficiência de tamponamento, devido a sua menor densidade, e menor tensão superficial quando comparado ao PFOC e F_6H_8 além da ocorrência de freqüentes problemas, como

redescolamentos da retina e complicações tardias, como catarata, glaucoma e alterações corneanas (Chan and Okun., 1986). Portanto, existe um interesse cada vez maior em substâncias que possam ser utilizadas não apenas durante a cirurgia, mas como um substituto vítreo de longo prazo ou, mesmo, permanente. Os resultados deste estudo mostram que o F_6H_8 apresenta melhores características para ser mantido no olho no pós-operatório do que o PFOC, embora os possíveis efeitos secundários e o tempo preciso de uso ainda necessitem ser definidos em estudos posteriores.



BIBLIOGRAFIA

- Chan C. & Okun E. The question of ocular tolerance to intravitreal liquid silicone - A long-term analysis. *Ophthalmology*, **93**: 651-660, 1986.
- Chang S., Zimmerman N., Iwamoto T., Ortiz R., Faris D. Experimental vitreous replacement with Perfluorotributylamine. *Am. J. Ophthalmol.* **103**: 29-37, 1987.
- Chang S., Ozmert E., Zimmerman N. Intraoperative Perfluorocarbon Liquids in the Management of Proliferative Vitreoretinopathy. *American Journal of Ophthalmology*, **106**: 668-674, 1988.
- Chang S., Reppucci V., Zimmerman N., Heinemann M., Coleman J. Perfluorocarbon liquids in the management of traumatic retinal detachments. *Ophthalmology*, **96**: 785-792, 1989.
- Chang S., Sparrow J. R., Iwamoto T., Gershbein A., Ross R., Ortiz R. Experimental studies of tolerance to intravitreal Perfluoro-N-octane liquid. *Retina*, **11**: 367-374, 1991.
- Eckardt C., Nicolai U., Winter M., Knop E. Experimental intraocular tolerance to liquid Perfluorooctane and Perfluoropolyether. *Retina*, **11**: 375-384, 1991.
- Estacia P., Santos Jr., Moreira L., Genari S. C. The cytotoxicity in Vero cells of perfluorocarbon used in vitreoretinal surgery. *Braz. J. morphol. Sci.* **19**, 41-47, 2002.
- Glaser M. B., Carter B. J., Kuppermann D. B., Michels G. R. Perfluorooctane in the treatment of giant retinal tears with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology*, **98**: 1613-1621, 1991.
- Green K., Slagle T., Chaknis M., Cheeks L., Chang S. Perfluorocarbon effects on rabbit blood-retinal barrier permeability. *Ophthalmic. Res.* **25**: 186-191, 1993.
- ISO 10993-1 Biological evaluation of medical devices- Part. 5.-Tests for cytotoxicity: "in vitro" methods, 1992.
- Kirchhof B., Fluorcarbones in Vitreoretinal Surgery. *Ophthalm-Chirurgie*, **11**: 153-158, 1999.
- Kirchhof B., Wong D., Meurs J., Hilgers R., Macek M., Lois N., Schrage N. Use of Perfluorohexilooctane as long-term internal tamponade agent in complicated retinal detachment surgery. *Am J. Ophthalmol.* **133**: 95-101, 2002.

- Kirkpatrick C.J. Biological testing of materials and medical devices. A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity in vitro. *Reg. Affairs* **4**: 13-32, 1992.
- Langefeld S., Kirchhof B., Meinert H., Roy T., Aretz A., Schrage N. A new way of removing silicone oil from the surface of silicone intraocular lenses. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **237**: 201-206, 1999.
- Liang C, Peyman G. Tolerance of extended term vitreous replacement with perfluoro-n-octane and perfluoroperhydrophenanthrene mixture (Phenooctane). *Retina*, **19**: 230-237, 1999.
- Lison, L. *Histochemie et Cytochemie Animales – Principes et Methodes*. Gauthier Villars, Paris, 1960.
- Meinert H., Mader J., Röhlke W., Geister U., Lang G. E., Lang G. K., Kreiner C. F., Chemical and physical stability of perfluorocarbons with laser treatment. *European Journal of Ophthalmology*, **5**: 219-224, 1995.
- Meinert H. & Roy T. Semifluorinated alkanes – A new class of compounds with outstanding properties for use in ophthalmology. *Eur. Ophthalmol.* **10**: 189-197, 2000.
- Meller D., Augustin A. J., Spitznas M., Lutz J., Meller K. Effect of different perfluorochemicals on dorsal root ganglion cells in vitro. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **236**: 182-187, 1998.
- Mello, M.L.S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. *Braz. J. Genetics* **20**: 257-264, 1997.
- Mertens S., Bednarz J., Richard G., Engelmann K. Effect of perfluorodecalin on human retinal pigment epithelium and human corneal endothelium in vitro. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **238**: 181-185, 2000.
- Módis L. Organization of the Extracellular Matrix: A polarization Microscopic Approach, CRC Press, Boca Raton, 1991
- Moreira Jr. C., Uscocovich C., Moreira A. Experimental studies with Perfluorooctane for hemostasis during vitreoretinal surgery. *Retina*, **17**: 530-534, 1997.
- Murakami N., Fukuchi S., Takeuchi K., Hori T., Shibamoto S., Ito F. Antagonistic regulation of cell migration by epidermal growth factor and glucocorticoid in Human gastric carcinoma cells. *J. Cell Physiol.* **176**: 127-137, 1998.

- Peyman G., Schulman J., Sullivan B. Perfluorocarbon Liquids in Ophthalmology. *Survey Ophthalmol.* **39**: 375-395, 1995.
- Singer H. New studies further define role of PFCLs in vitreoretinal surgery. *Ocular Surgery News*, **17**: 50, 1999.
- Sparrow J., Jayakumar A., Berrocal M., Ozmert E., Chang S. Experimental studies of the combined use of vitreous substitutes of high and low specific gravity. *Retina* **12**: 134-140, 1992.
- Stolba U., Krepler K., Pflug R., Velikay M., Wedrich A., Binder S. Experimental vitreous and aqueous replacement with perfluorophenanthrene. *Retina*, **17**: 146-153, 1997.
- Stolba U., Krepler K., Velikay M., Binder S. Anterior segment changes in rabbits after experimental aqueous replacement with various amounts of different perfluorocarbon liquids. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **237**: 501-507, 1999.
- Velikay M., Wedrich A., Stolba U., Datlinger P., Li W., Binder S. Experimental long-term vitreous replacement with purified and nonpurified Perfluorodecalin. *Am. J. Ophthalmol.* **116**: 565-570, 1993.
- Winter M., Winter C., Wiechens B. Quantification of intraocular retained perfluorodecalin after macroscopic complete removal. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **237**: 153-156, 1999.
- Wong D. & Lois N. Perfluorocarbons and Semifluorinated Alkanes. *Seminars in Ophthalmology*, **15**: 25-35, 2000.
- Zeana D., Becker J., Kuckelkorn R., Kirchhof B. Perfluorohexilooctane as long-term vitreous tamponade in the experimental animal. *Int. Ophthalmol.* **2**: 17-24, 2000.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Análise da citotoxicidade indireta do PFOC e do F6H8. Todas as abordagens experimentais utilizadas foram consideradas não significativamente diferentes (nível de 0,05) em relação aos controles utilizados (PFOC: perfluoctano; F6H8: perfluorohexiloctane).

Figura 2: Células Vero incubadas com PFOC e coradas com Azul de Toluidina em pH 4,0. **A)** Controle negativo do experimento (sem tratamento); **B)** Células após 12 horas do efeito do peso das lamínulas com equivalência ao peso e área de PFOC; **C)** Células sob a ação tóxica do silicone com peso e área equivalente a do PFOC; **D)** Células cultivadas em meio de cultura com PFOC sem contato direto; **E)** Células sob o efeito compressivo do PFOC. Para todas as figuras: Barra de aumento = 50µm.

Figura 3: Células Vero incubadas com F₆H₈ e coradas com Azul de Toluidina em pH 4,0. **A)** Controle negativo do experimento (sem tratamento); **B)** Células após 12 horas do efeito do peso das lamínulas com equivalência ao peso e área de F₆H₈; **C)** Células sob a ação tóxica do silicone com peso e área equivalentes ao do F₆H₈; **D)** Células cultivadas em meio de cultura com F₆H₈ sem contato direto; **E)** Células sob o efeito compressivo do F₆H₈. Para todas as figuras: Barra de aumento = 50µm.

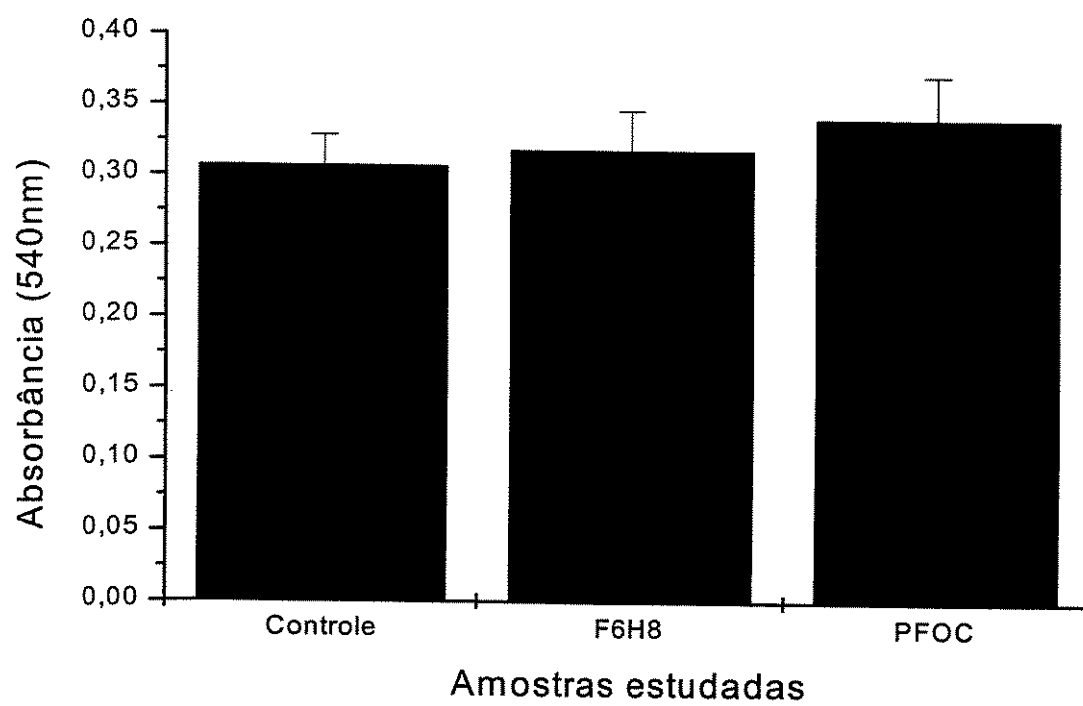
Figura 4: Células Vero incubadas com PFOC e coradas com Xilidine Ponceau em pH 2,5. **A)** Controle negativo do experimento (sem tratamento); **B)** Células após 12 horas do efeito do peso das lamínulas com equivalência ao peso e área de PFOC; **C)** Células sob a ação tóxica do silicone com peso e área equivalentes ao do PFOC; **D)** Células cultivadas em meio de cultura com PFOC, mas sem contato direto; **E)** Células sob o efeito compressivo do PFOC. Para todas as figuras: Barra de aumento = 50µm.

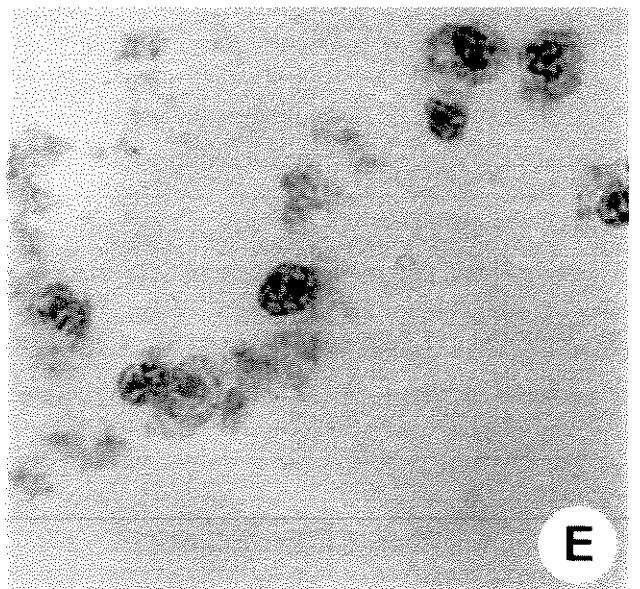
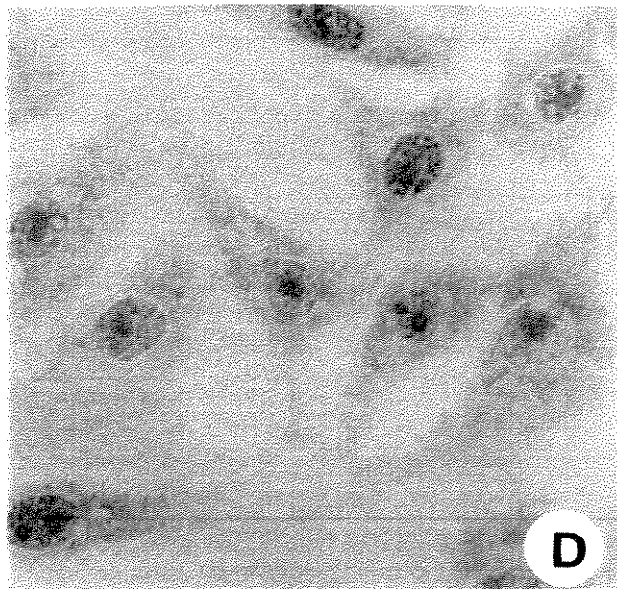
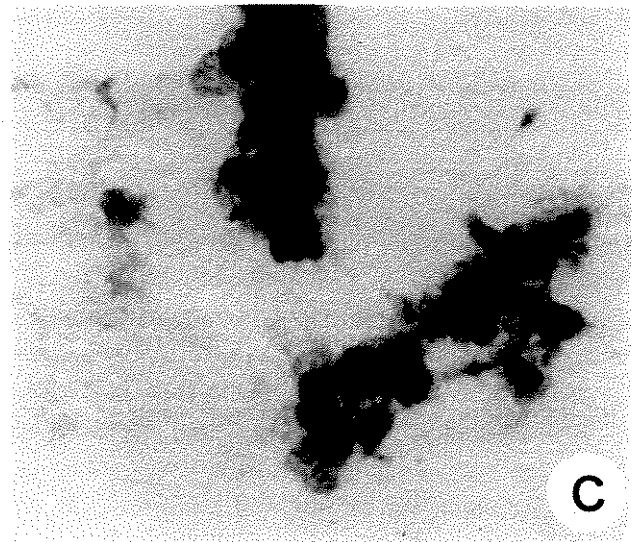
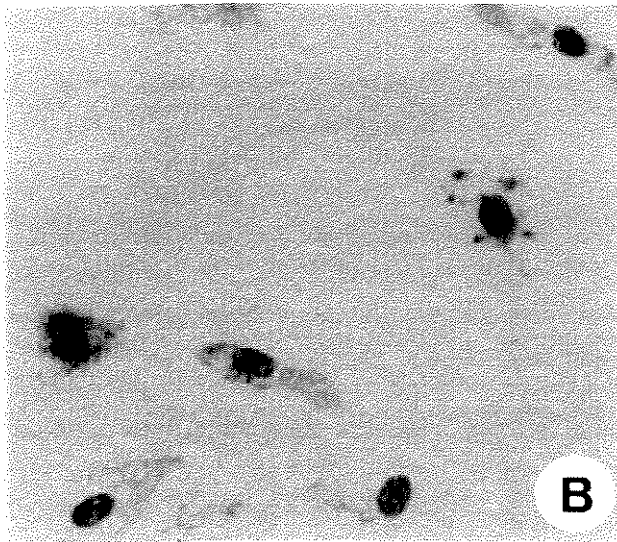
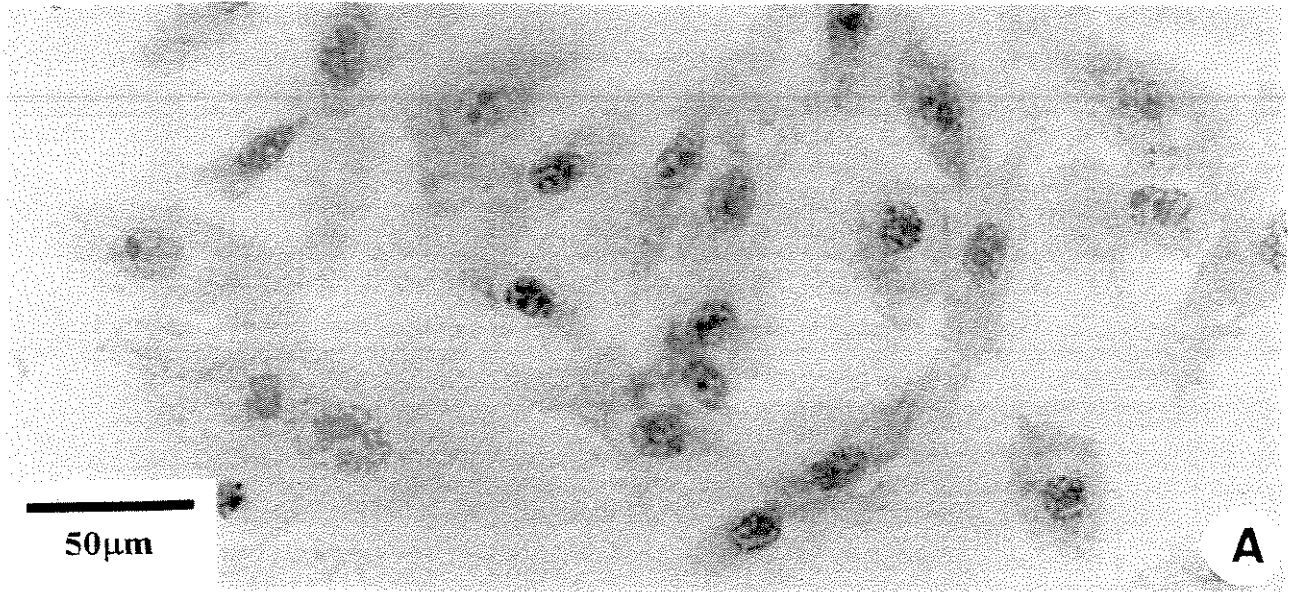
Figura 5: Células Vero incubadas com F_6H_8 e coradas com Xilidine Ponceau em pH 2,5. **A)** Controle negativo do experimento (sem tratamento); **B)** Células após 12 horas do efeito do peso das lamínulas com equivalência ao peso e área do F_6H_8 ; **C)** Células sob a ação tóxica do silicone com peso e área equivalentes ao do F_6H_8 ; **D)** Células cultivadas em meio de cultura com F_6H_8 mas sem contato direto; **E)** Células sob o efeito compressivo do F_6H_8 . Para todas as figuras: Barra de aumento = $50\mu m$.

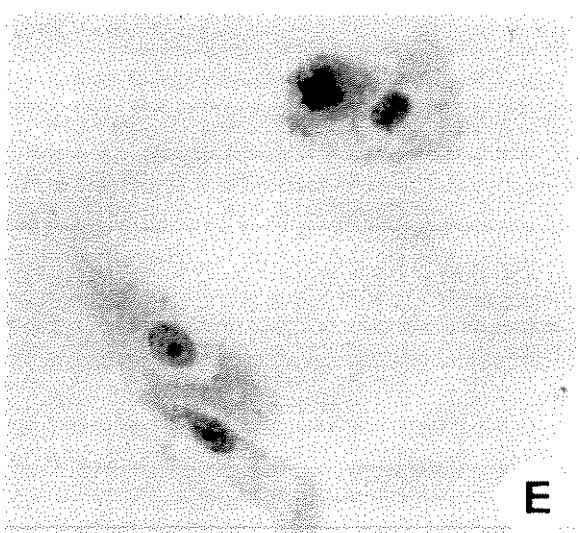
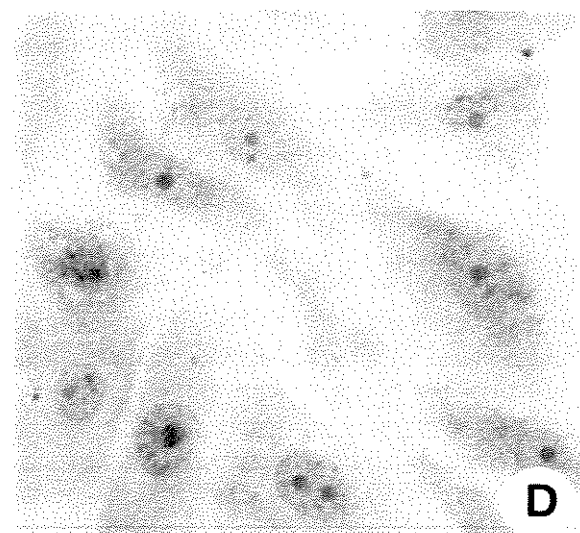
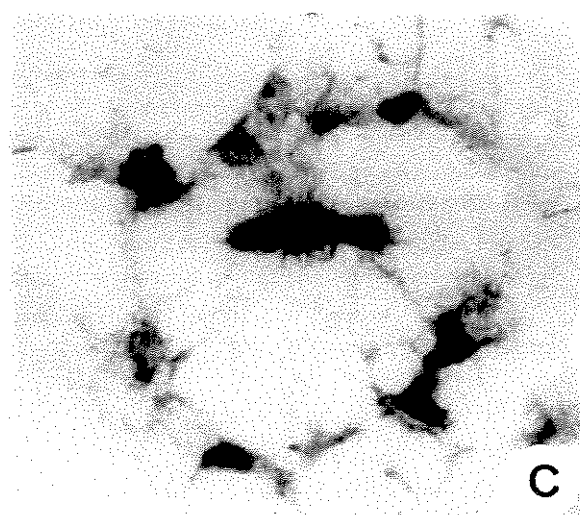
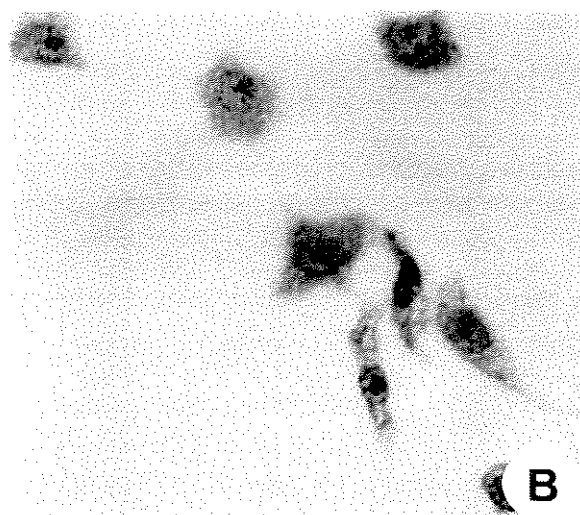
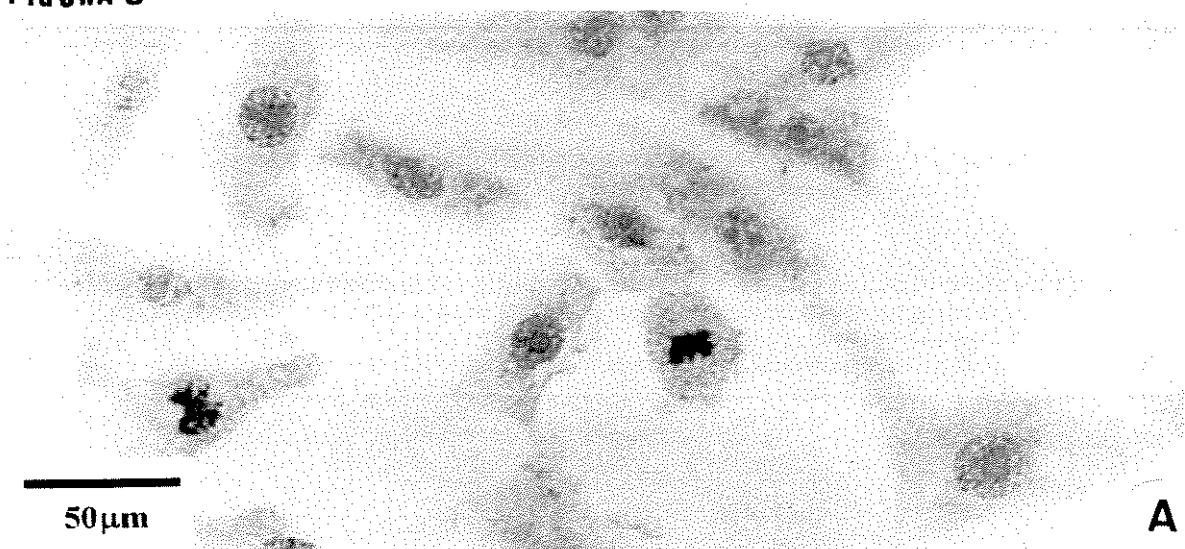
Figura 6: Imunocitoquímica: Células Vero, cultivadas em diferentes condições experimentais e incubadas com anticorpos monoclonais antiactina. **A)** Controle negativo do experimento (sem tratamento); **B)** Células sob a ação tóxica do silicone com peso e área equivalentes ao PFOC; **C)** Células sob contato com o PFOC; **D)** Células sob a ação tóxica do silicone com peso e área equivalentes a do F_6H_8 ; **E)** Células sob o contato com o F_6H_8 . Para todas as figuras: Barra de aumento = $50\mu m$ (**A**, **C**, e **E**) ou $100\mu m$ (**B** e **D**).

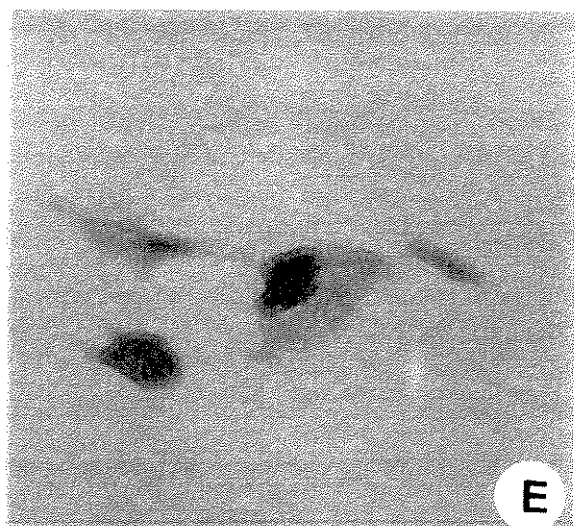
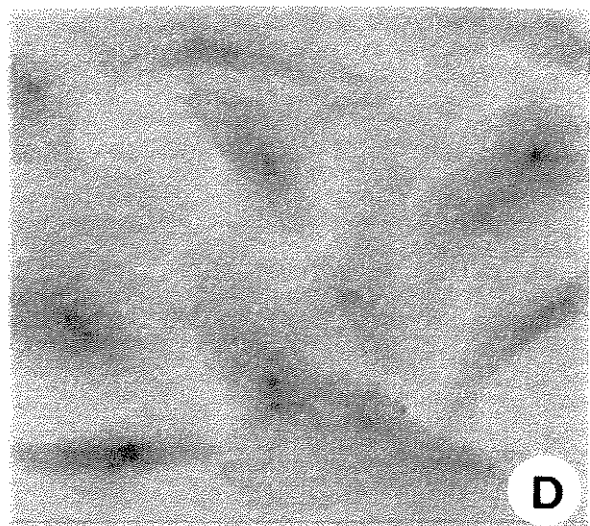
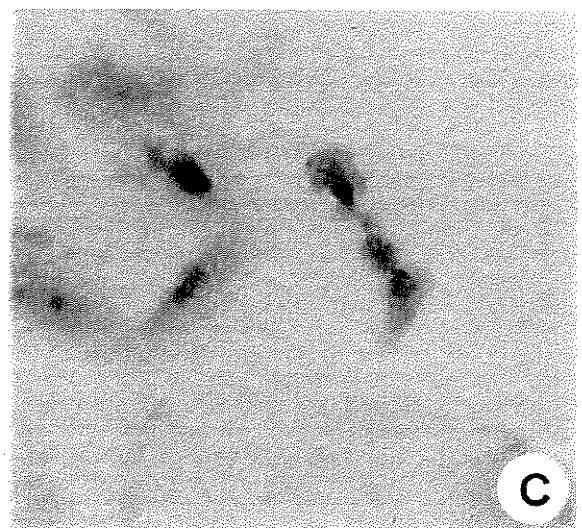
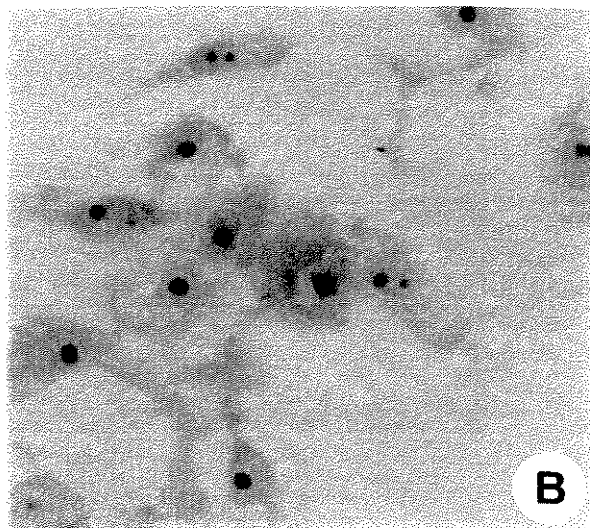
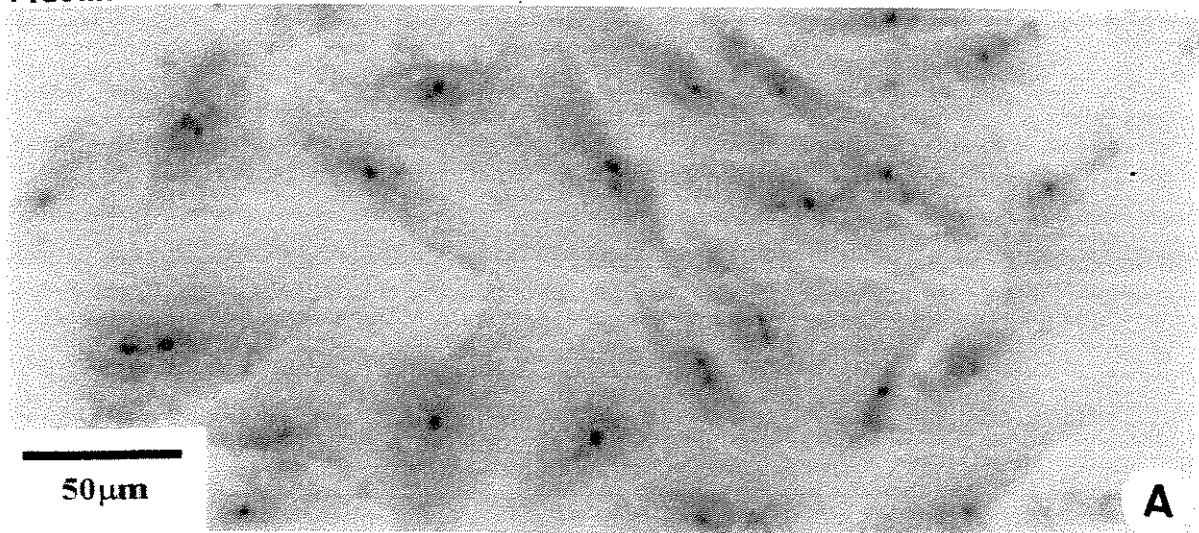
Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura das células Vero submetidas às diferentes condições experimentais. **A)** Controle negativo do experimento (sem tratamento); **B)** Células submetidas ao efeito do peso compressivo equivalente ao peso e área do PFOC; **C)** Células sob o contato com o PFOC; **D)** Células submetidas ao efeito do peso compressivo equivalente ao peso e área do F_6H_8 ; **E)** Células sob o contato com o F_6H_8 . Para todas as figuras: Barra de aumento = $10\mu m$.

FIGURA 1









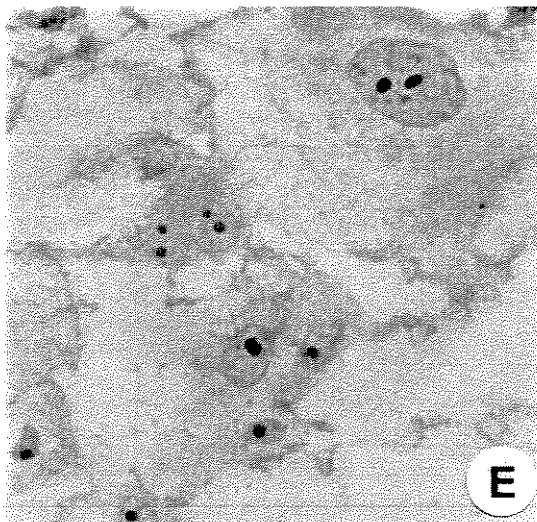
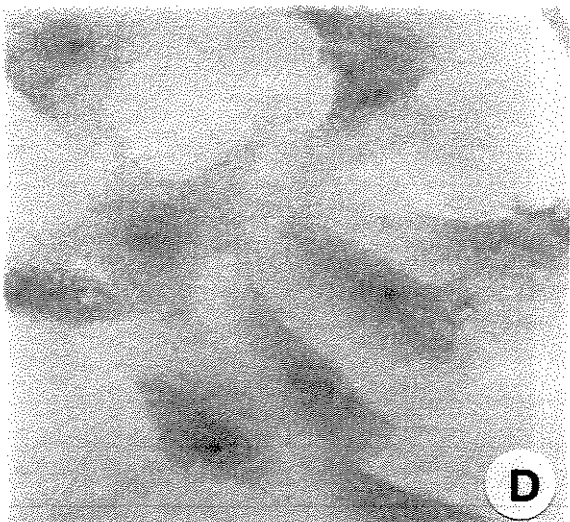
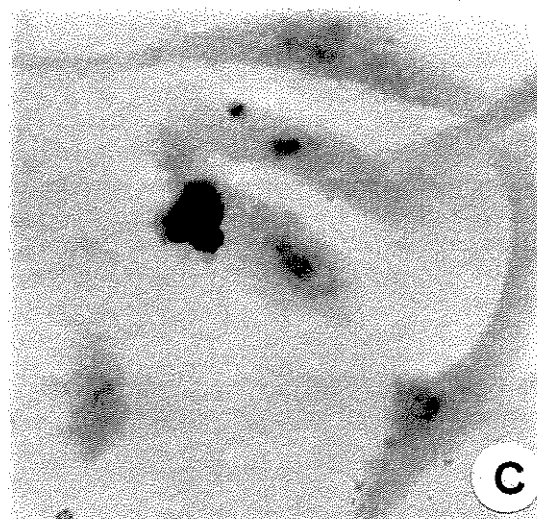
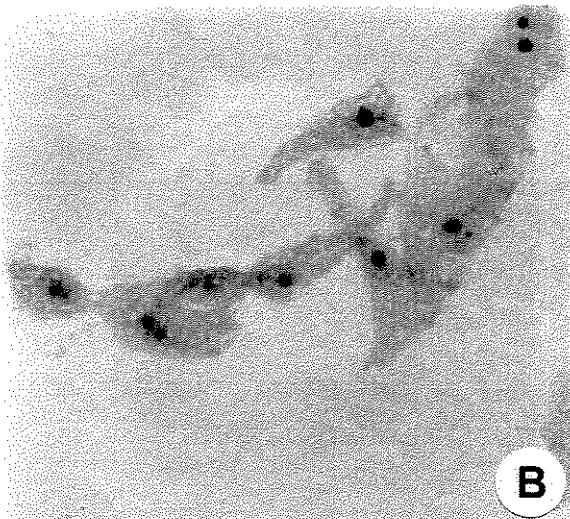
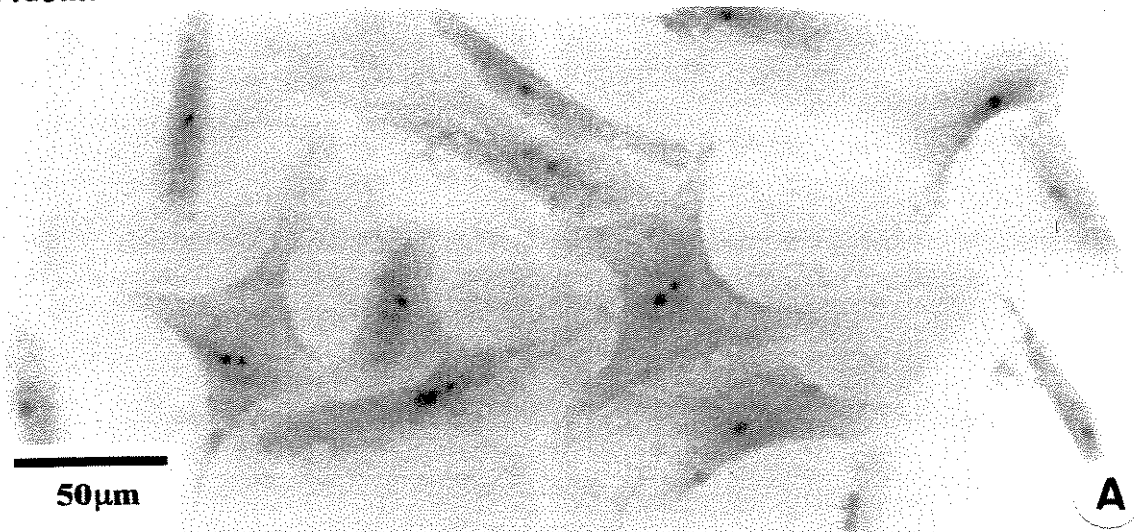
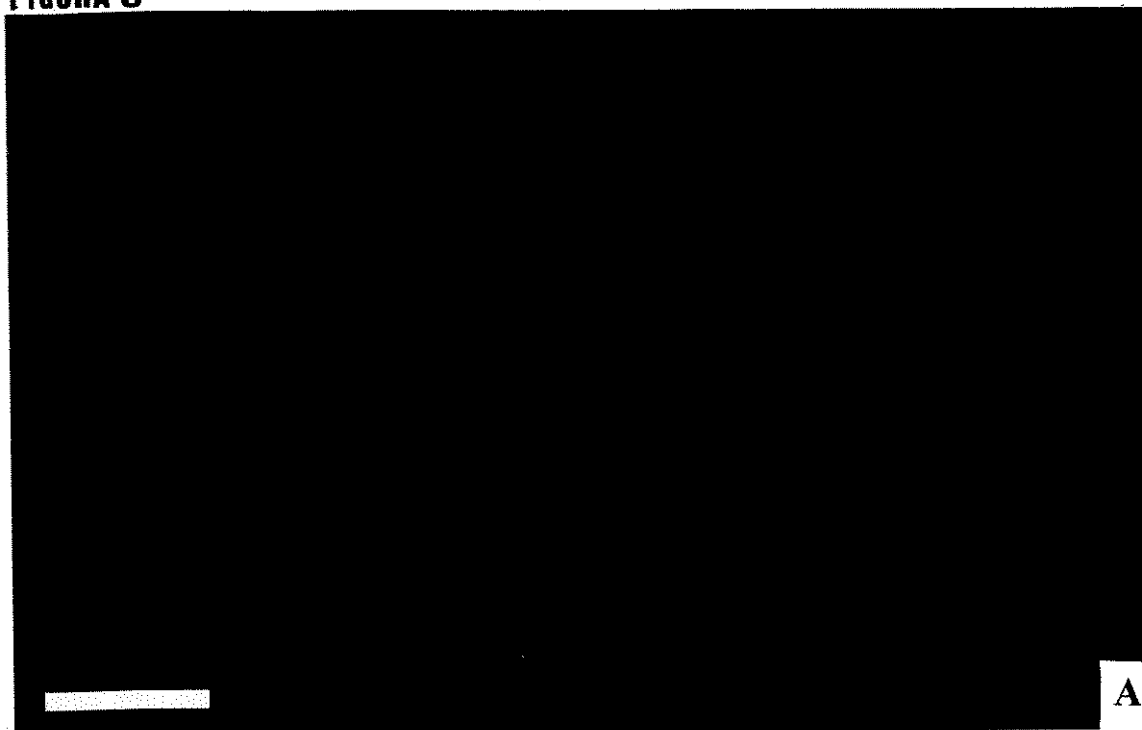
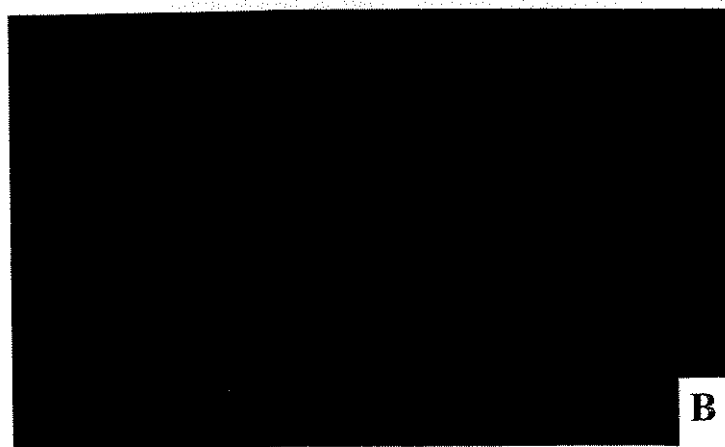


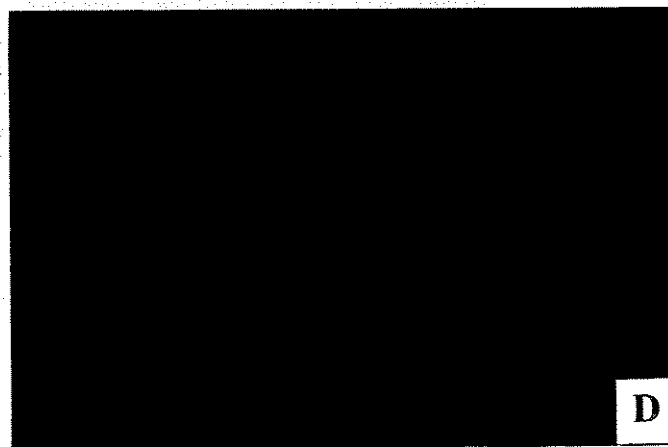
FIGURA 6



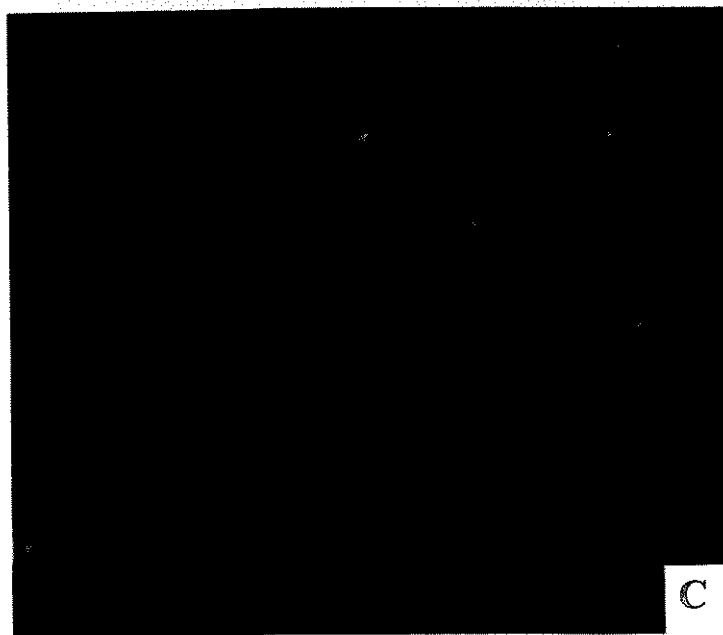
A



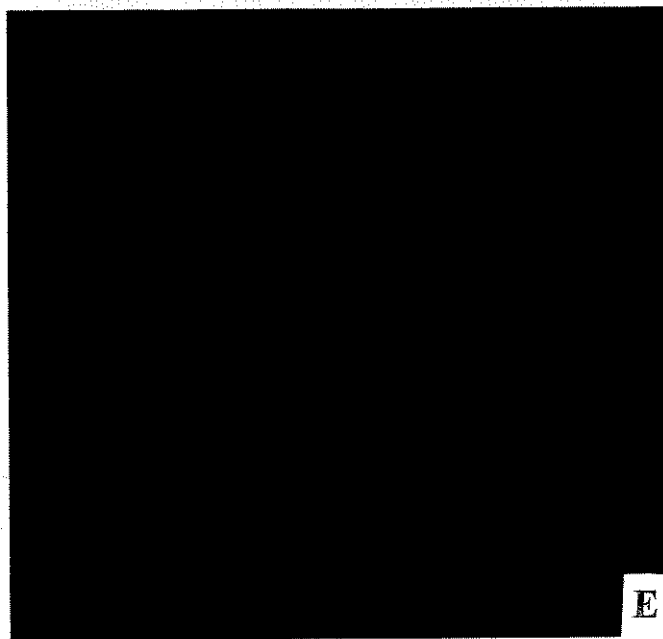
B



D

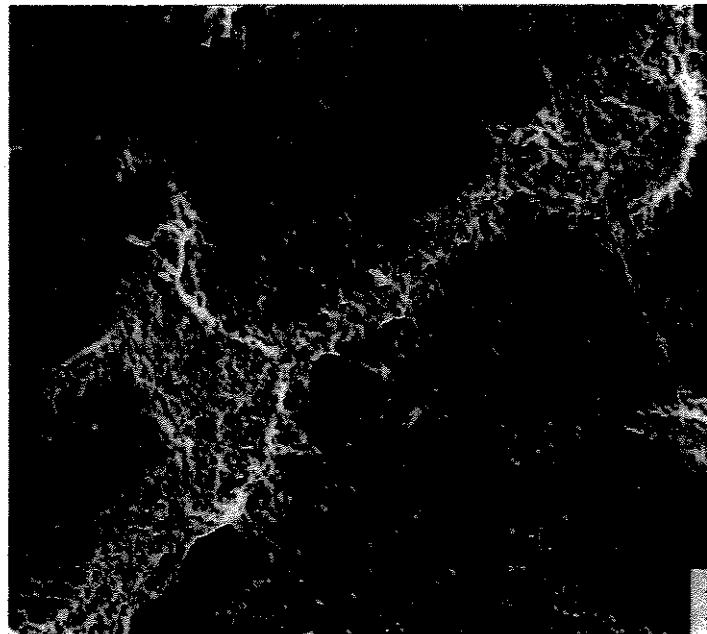
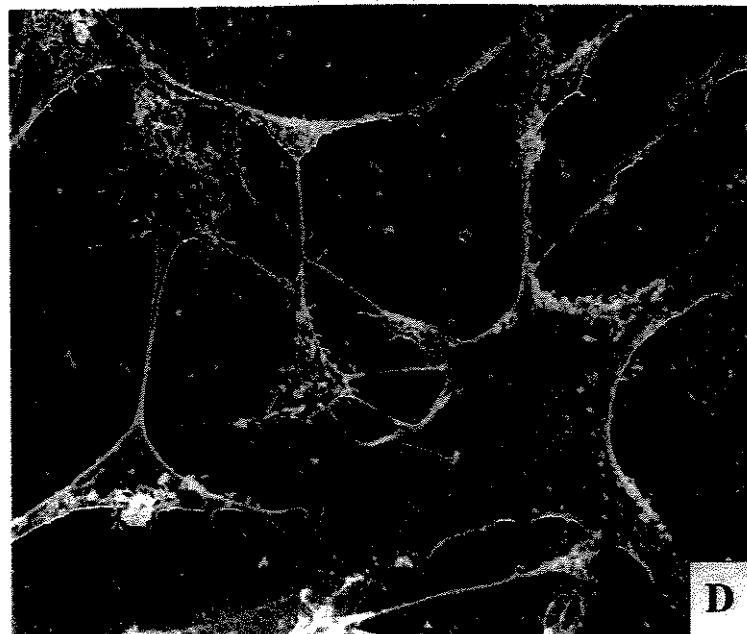
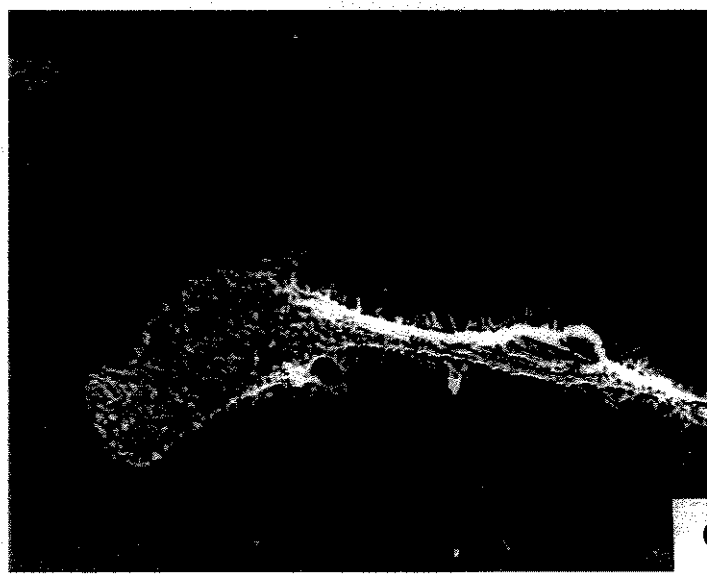
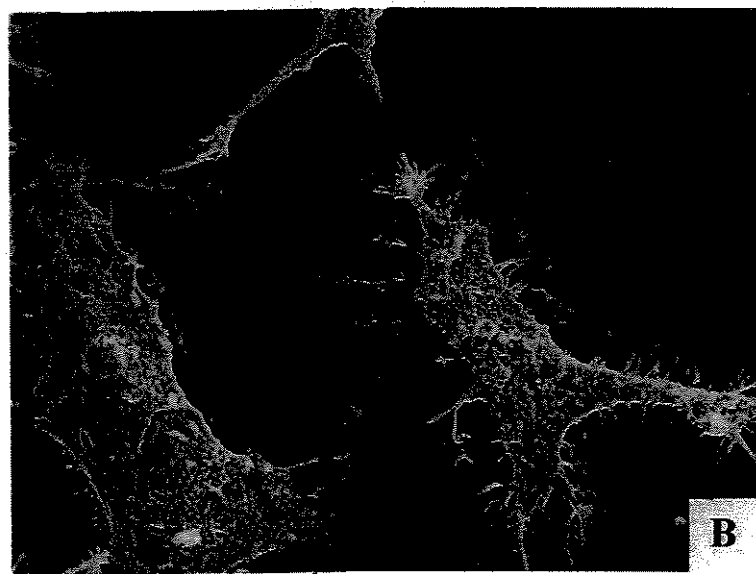
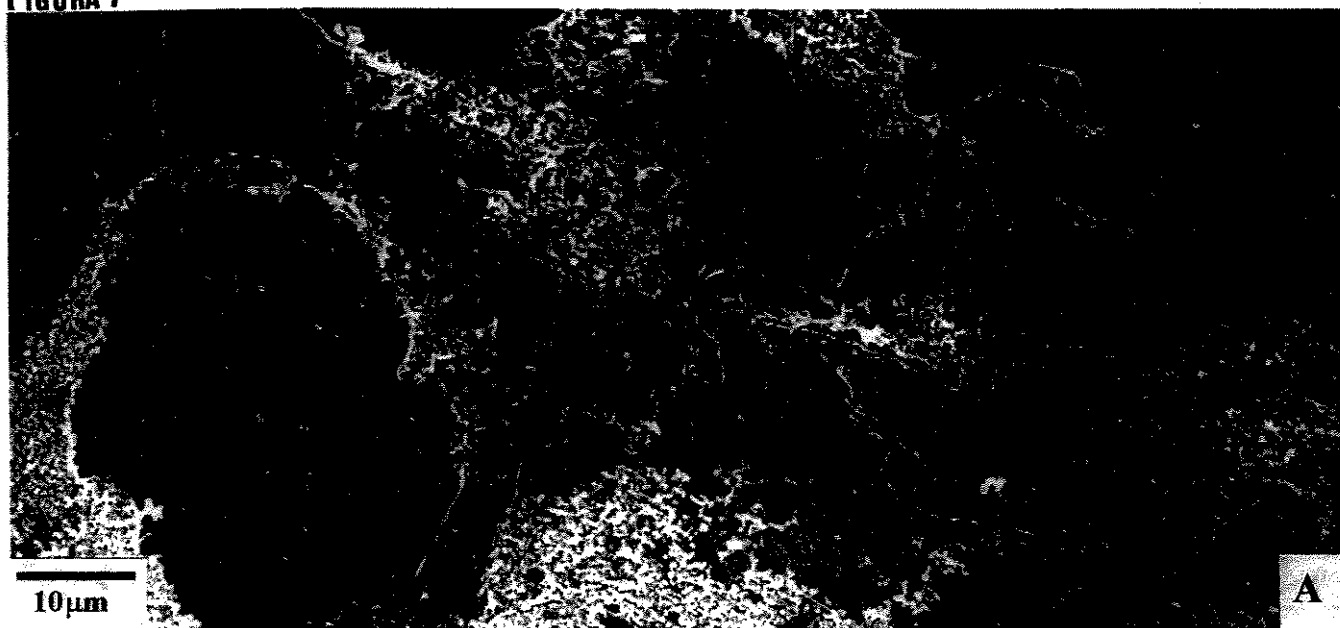


C



E

FIGURA 7

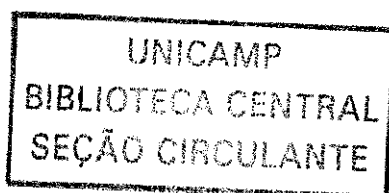


IV – CONCLUSÕES

As estratégias e métodos de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura demonstraram que nas condições deste estudo:

1. Tanto o perfluorooctano (PFOC) quanto o perfluorohexilooctano (F_6H_8) não apresentaram efeito citotóxico indireto. Sendo assim, todas as alterações mediadas tanto pelo PFOC quanto pelo F_6H_8 são dependentes de contato.
2. As alterações induzidas pelo perfluorooctano (PFOC) são distintas das ocasionadas apenas pelo efeito compressivo que este pudesse apresentar sobre as células, mas condizentes com a atividade tóxica desse composto.
3. Perfluorohexilooctano (F_6H_8) não apresentou efeito tóxico sobre as células estudadas; assim, as alterações encontradas são decorrentes de compressão mecânica exercida pelo peso do composto.
4. O perfluorohexilooctano (F_6H_8) apresenta melhores característica para ser mantido no olho no pós-operatório do que o perfluorooctano (PFOC), embora o tempo preciso de uso ainda necessite ser definido em estudos posteriores.

V - BIBLIOGRAFIA



- Acedo J. T. *Queratoplastias y Queratoprótesis* Edika-Med S.A., Barcelona, 1992.
- ASTM F813-83. Standart practice for direct contact cell culture evaluation of materials for medical devices, 1983.
- Chan C. & Okun E. The question of ocular tolerance to intravitreal liquid silicone - A long-term analysis. *Ophthalmology*, **93**: 651-660, 1986.
- Chang S. Low viscosity liquid Fluorochemicals in vitreous surgery. *Am. J. Ophthalmol.* **103**: 38-43, 1987.
- Chang S., Zimmerman N., Iwamoto T., Ortiz R., Faris D. Experimental vitreous replacement with Perfluorotributylamine. *Am. J. Ophthalmol.* **103**: 29-37, 1987.
- Chang S., Ozmert E., Zimmerman N. Intraoperative Perfluorocarbon Liquids in the Management of Proliferative Vitreoretinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* **106**: 668-674, 1988.
- Chang S., Reppucci V., Zimmerman N., Heinemann M., Coleman J. Perfluorocarbon liquids in the management of traumatic retinal detachments. *Ophthalmology*, **96**: 785-792, 1989.
- Chang S., Sparrow J. R., Iwamoto T., Gershbein A., Ross R., Ortiz R. Experimental studies of tolerance to intravitreal Perfluoro-N-octane liquid. *Retina* **11**: 367-374, 1991.
- Coll E. G., Chang S., Sun J., Wieland R. M., Berrocal H. M. Perfluorocarbon liquid in the management of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology*, **102**: 630-639, 1995.
- Eckardt C., Nicolai U., Winter M., Knop E. Experimental intraocular tolerance to liquid Perfluorooctane and Perfluoropolyether. *Retina*, **11**: 375-384, 1991.
- Estacia P., Santos Jr., Moreira L., Genari S. C. The cytotoxicity in Vero cells of perfluorocarbon used in vitreoretinal surgery. *Braz. J. morphol. Sci.* **19**: 41-47, 2002.
- Genari S. C., Dolder M. A. H., Wada M. L. F. Scanning and transmission electron microscopy of a transformed Vero cells, with altered *in vitro* growth characteristics. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol* **28**: 565-552, 1996.
- Glaser M. B., Carter B. J., Kuppermann D. B., Michels G. R. Perfluorooctane in the treatment of giant retinal tears with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology*, **98**: 1613-1621, 1991.

- Grayson M. *Diseases of the cornea* C.V. Mosby Company, St. Louis: 1983.
- Green K., Slagle T., Chaknis M., Cheeks L., Chang S. Perfluorocarbon effects on rabbit blood-retinal barrier permeability. *Ophthalmic. Res.* **25**: 186-191, 1993.
- Haas V.R., Santos Jr. A. R., Wada M.L.F. Behaviour of fibroblastic cells cultured in collagen I using the sandwich technique. *Cytobios*, **106**: 255-267, 2001.
- Highlights of Ophthalmology, Ed. Brasileira, Mini Atlas 22, Fig. 9-62-B, 26, Highlights of Ophthalmology Int'l, Panamá, 2000.
- Hoerauf H., Kobuch K., Dresch J., Menz D. Combined use of partially fluorinated alkanes, perfluorocarbon liquids and silicone oil: an experimental study. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **239**: 373-381, 2001.
- Hoppenreijds V., Pels E., Vrensen G., Treffers F. Corneal endothelium and growth factors. *Survey of Ophthalmology*, **41**: 155-164, 1996.
- ISO 10993-1 Biological evaluation of medical devices- Part. 5.-Tests for cytotoxicity: "in vitro" methods.1992.
- Kirchhof B. Fluorocarbons in Vitreoretinal Surgery. *Ophthalm-Chirurgie* **11**: 153-158, 1999.
- Kirchhof B., Wong D., Meurs J., Hilgers R., Macek M., Lois N., Schrage N. Use of Perfluorohexilooctane as long-term internal tamponade agent in complicated retinal detachment surgery. *Am J. Ophthalmol* **133**: 95-101, 2002.
- Kirkpatrick C.J. Biological testing of materials and medical devices. A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity in vitro. *Reg. Affairs*, **4**: 13-32, 1992.
- Kobuch K., Menz H. D., Hoerauf H., Dresch H. J., Gabel V. New substances for intraocular tamponades: perfluorocarbon liquids, hydrofluorocarbon liquids and hydrofluorocarbon-oligomers in vitreoretinal surgery. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **239**: 635-642, 2001.
- Langefeld S., Kirchhof B., Meinert H., Roy T., Aretz A., Schrage F. N. A new way of removing silicone oil from the surface of silicone intraocular lenses. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **237**: 201-206, 1999.
- Leibowitz H. M. *Corneal Disorders* W. B. Saunders Company, Philadelphia:1984.

- Liang C. & Peyman G. Tolerance of extended term vitreous replacement with perfluoro-*n*-octane and perfluoroperhydrophenanthrene mixture (Phenooctane). *Retina* **19**: 230-237, 1999.
- Loewenstein A., Humayun M., De Juan Jr. E., Campochiaro P., Haller J. Perfluoroperhydrophenanthrene versus Perfluoro-*n*-octane in vitreoretinal surgery *Ophthalmology*, **107**: 1078-1082, 2000.
- Malmonge S. M., Zavaglia C. A. C, Santos Jr. A. R., Wada M. L. F. Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de poliHEMA: um estudo in vitro. *Rev. Bras. Eng. Biomed.* **15**: 49-54. 1999.
- Mathis A., Pagot V., Gazagne C., Malecaze F. Giant retinal tears. Surgical techniques and results using perfluorodecalin and silicone oil tamponade. *Retina*, **12**: S7-10, 1992.
- Meinert H., Mader J., Röhlke W., Geister U., Lang G. E., Lang G. K., Kreiner C. F., Chemical and physical stability of perfluorocarbons with laser treatment. *Eur. Ophthalmol.* **5**: 219-224, 1995.
- Meller D., Augustin A. J., Spitznas M., Lutz J., Meller K. Effect of different perfluorochemicals on dorsal root ganglion cells in vitro. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **236**: 182-187. 1998.
- Mertens S., Bednarz J., Richard G., Engelmann K. Effect of perfluorodecalin on human retinal pigment epithelium and human corneal endothelium in vitro. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **238**: 181-185, 2000.
- Moreira Jr. C., Uscocovich C., Moreira A. Experimental studies with Perfluorooctane for Hemostasis during vitreoretinal surgery. *Retina*, **17**: 530-534, 1997.
- Peyman G., Schulman J., Sullivan B. Perfluorocarbon Liquids in Ophthalmology. *Survey Ophthalmol.* **39**: 375-395, 1995.
- Queiroz Jr. J. M., Moreira H., Liggett P. E., Mc Donnell P. J., Özler A. S. Estudo da toxicidade corneana de dois perfluorocarbonos líquidos. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, **55**: 244-248, 1992.
- Santos Jr. A. R., Barbanti S.H., Duek E.A.R., Dolder H., Wada R.S., Wada M.L.F. Growth and differentiation of Vero cells on poly(L-lactic acid) membranes of different pore diameters. *Artif Organs* **25**: 7-13, 2001.
- Sigelman J. *Retinal Diseases* Little, Brown and Company, Boston:1984.

- Sparrow J., Jayakumar A., Berrocal M., Ozmert E., Chang S. Experimental studies of the combined use of vitreous substitutes of high and low specific gravity. *Retina* 12: 134-140, 1992.
- Stolba U., Krepler K., Pflug R., Velikay M., Wedrich A., Binder S. Experimental vitreous and aqueous replacement with perfluorophenanthrene. *Retina*, 17: 146-153, 1997.
- Stolba U., Krepler K., Velikay M., Binder S. Anterior segment changes in rabbits after experimental aqueous replacement with various amounts of different perfluorocarbon liquids. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 237: 501-507, 1999.
- Sudhalkar A. H. & Johnson W. Perfluorocarbon liquid manipulation of high-density intraocular foreign bodies. *Retina*, 18: 460-465, 1998.
- Velikay M., Wedrich A., Stolba U., Datlinger P., Li W., Binder S. Experimental long-term vitreous replacement with purified and nonpurified Perfluorodecalin. *Am. J. Ophthalmol.* 116: 565-570, 1993.
- Velikay M., Stolba U., Wedrich A., Li Y., Datlinger P., Binder S. The effect of chemical stability and purification of perfluorocarbon liquids in experimental extended-term vitreous substitution. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 233: 26-30, 1995.
- Winter M., Winter C., Wiechens B. Quantification of intraocular retained perfluorodecalin after macroscopic complete removal. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 237: 153-156, 1999.
- Wong D. & Lois N. Perfluorocarbons and Semifluorinated Alkanes. *Seminars in Ophthalmology*, 15: 25-35, 2000.
- Zeana D., Schrage N., Kirchhof B., Wenzel M. Silicone oil removal from a silicone intraocular lens with perfluorohexyloctane. *J. Cataract Refract. Surg.*, 26:301-302, 2000. (a)
- Zeana D., Becker J., Kuckelkorn R., Kirchhof B. Perfluorohexyloctane as long-term vitreous tamponade in the experimental animal. *Int. Ophthalmol.* 2: 17-24, 2000. (b)

