

TERUO AIHARA

**TOXICIDADE DO HEXAFLUORETO DE ENXOFRE E DO LÍQUIDO
PERFLUOROCARBONADO PARA A RETINA DE COELHOS**

Tese apresentada à Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, para obtenção do Título de Doutor em Medicina.

Ribeirão Preto

1998

Aihara, Teruo

Toxicidade do Hexafluoreto de enxofre e do líquido perfluorocarbonado para a retina de coelhos. / Teruo Aihara. -- Ribeirão Preto, 1998.

89p.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

1. Descolamento da retina: 2. Hexafluoreto de enxofre; 3. Retinopexia pneumática; 4. Líquido perfluorocarbono: 5. L-glutamato.

TERUO AIHARA

**TOXICIDADE DO HEXAFLUORETO DE ENXOFRE E DO LÍQUIDO
PERFLUOROCARBONADO PARA A RETINA DE COELHOS**

Tese apresentada à Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, para obtenção do Título de Doutor em Medicina.

Orientador:

Prof. Dr. Nivaldo Vieira de Souza

Ribeirão Preto

1998

AGRADECIMENTOS

Sou profundamente grato às pessoas que empenharam em proporcionar-me, nas mais variadas formas, condições para que este trabalho pudesse ser realizado:

Prof. Dr. Carlos Ramos de Souza-Dias, Professor Pleno da Disciplina de Oftalmologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

Prof. Dr. Geraldo Vicente de Almeida, Diretor do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo.

Prof. Dr. Raph Cohen, Professor Titular do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo.

Prof. Dr. Carmo Mandia Júnior, Professor do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo.

Prof. Dr. Adamo Lui Netto, Professor do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo.

Prof. Dr. Roberto M. Endo, Professor do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo.

Dr. José Wilson Cursino, Professor Assistente do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo.

Dr. Wilson Roberto Silvino, Professor Assistente do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo.

Prof. Dr. Harley E. A. Bicas, Professor do Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Prof. Dr. Erasmo Romão, Professor do Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Profa. Dra. Maria Lourdes Veronese Rodrigues, Professora do Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Prof. Dr. Antonio Augusto Velasco Cruz, Professor do Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Prof. Dr. Argemiro Lauretti Filho, Professor do Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Dr. Jaime N. Kagohara, Médico Assistente da Secção de Retina e Vítreo do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo.

Dra. Noemi N. Nishide, Médica Assistente da Secção de Retina e Vítreo do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo.

Dr. Ricardo Themudo Lessa Waetge, Médico Assistente do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo.

Dr. Jorge Mitre, Médico Assistente da Secção de Retina e Vítreo do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo.

Dr. Carlos F. Uesugui, Assistente do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo.

Dra. Cleide Toshie Myai, Médica Estagiária do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo.

Dr. Mário M. Ogata, ex-Assistente do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo.

Dr. Carlos Roberto Lourenço Fávaro, Oftalmologista de Ituverava, São Paulo.

Dr. Isack Oguime, Médico do Hospital das Clínicas de Suzano, São Paulo.

Às Secretárias do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto: Cecília, Amélia, Rita e Ivone.

À Valquíria Aparecida Gomes dos Santos, minha secretária.

Ao Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Aos técnicos do biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Dr. Acácio Alves de Souza Lima Filho, do laboratório Ophthalmos.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

É imprescindível meu registro de agradecimento sincero e profundo aos Professores:

Prof. Dr. NIVALDO VIEIRA DE SOUZA, Professor do Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Prof. Dr. JOAQUIM COUTINHO NETTO, Professor da Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Que me receberam, de braços abertos, orientando-me em todos os passos do trabalho, proporcionando-me conhecimento sólido, concederam-me atenção para dar solução às minhas dúvidas e acreditaram fortemente no meu empenho. Devido às suas inestimáveis dedicação, competência e amizade, meu trabalho existe.

Aos meus pais e irmãos.

Ao Giovanni e Tamara.

ABREVIATURAS

AA	-	Aminoácido
AAE	-	Aminoácido excitatório
AMPA	-	Ácido amino-fosfo-adípico
Asp	-	Ácido aspártico
CA	-	Câmara anterior
CME	-	Camada molecular externa
CMI	-	Camada molecular interna
CNV	-	Neovascularização da coróide
CPE	-	Camada plexiforme externa
CPI	-	Camada plexiforme interna
C3F8		Perfluopropano
DR	-	Descolamento de retina
EOR	-	Epitélio pigmentado da retina
ERG	-	Eletro-retinografia
GABA	-	Ácido gama amino butírico
Gly	-	Glicina
Glu	-	Ácido glutâmico
HCl	-	Ácido clorídrico
LIO	-	Lente intraocular
Lys	-	Lisina
LPFC	-	Líquido perfluorocarbono
LSR	-	Líquido sub-retínico
ml	-	Mililitro
MLE	-	Membrana limitante externa
MLI	-	Membrana limitante interna
N ₂	-	Nitrogênio
NMDA	-	Ácido-N-metil-D-aspartíco
NO ₂	-	Óxido nitroso
OPS	-	Ácido ortofosfoserina

PIO	- Pressão intraocular
PVR	- Proliferação vitreo-retinica
RD	- Retinopatia diabética
ROP	- Retinopatia da prematuridade
RP	- Retinopexia pneumática
SF6	- Hexafluoreto de enxofre
SNC	- Sistema nervoso central
Thr	- Tirosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 – Embriologia.....	02
1.2 – Descolamento de retina.....	03
1.2.1 – Tratamento do descolamento da retina.....	04
1.3 – Vitrectomia.....	07
1.4 – Retinopexia pneumática: Hexafluoreto de Enxofre (SF ₆).....	09
1.4.1 – Investigações recentes.....	11
1.4.2 – Escolha dos gases.....	12
1.4.3 – Seleção do paciente para retinopexia pneumática.....	14
1.4.4 – Tipos de descolamento de retina.....	15
1.4.5 – Técnica cirúrgica (retinopexia pneumática).....	16
1.4.6 – Vantagens e desvantagens da retinopexia pneumática.....	17
1.4.7 – Toxicidade do SF ₆	17
1.4.8 – Complicações da retinopexia pneumática.....	18
1.5 – Líquidos perfluorocarbonados.....	19
1.5.1 – Líquido perfluorcarbono.....	21
1.5.2 – Principais aplicações clínicas dos LPFC.....	23
1.6 – A retina como modelo de estudo da neurotoxicidade neuronal.....	26
1.6.1 – Aminoácidos excitatórios (L-Glutamato) e a neurotoxicidade neuronal.....	28

1.6.2 – O L-glutamato como neurotransmissor envolvido na lesão neuronal isquêmica.....	28
1.6.3 – Teoria da toxicidade excitatória – neuroexcitotoxicidade.....	30
1.6.4 – Patogênese da toxicidade excitatória.....	30
1.6.5 – Metabolismo do glutamato.....	31
2. OBJETIVOS.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 – Remoção do vítreo tratado e do globo ocular.....	36
3.2 – Estudo bioquímico.....	36
3.3 – Análise histológica.....	37
3.4 – Análise das amostras do vítreo.....	38
3.5 – Preparo das amostras para análise cromatográfica.....	39
3.6 – Método estatístico.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1 – Análise estatística.....	50
4.2 – Análise histológica.....	52
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÕES.....	62
7. RESUMO.....	64
8. SUMMARY.....	67
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Embriologia

As camadas da retina, a pigmentar externa e a neural interna têm origem comum, isto é, do ectoderma neural (vesícula óptica primitiva). Até aproximadamente 25 dias de gestação, o ectoderma neural sofre invaginação, formando a vesícula óptica. Na quarta semana (4,5 mm), a cavidade da vesícula óptica fecha-se completamente pela invaginação das suas paredes, formando o cálice óptico. As conseqüências desse processo de invaginação são a formação de dois folhetos: o folheto interno (cavidade vítrea) e o folheto externo do cálice óptico (superfície externa). Esses folhetos ou camadas apresentam agora um espaço virtual (fechamento da cavidade da vesícula óptica), que persiste durante a vida. As células da camada externa do cálice óptico se diferenciam em epitélio pigmentar definitivo da retina, corpo ciliar e camada anterior do epitélio pigmentar da íris; as células da camada interna formam a retina sensorial definitiva, epitélio não pigmentado do corpo ciliar e camada posterior do epitélio pigmentado da íris (DANTAS, 1989).

Em condições patológicas, o líquido pode penetrar no espaço virtual entre as camadas interna e externa da retina. Clinicamente, essa separação das duas camadas da retina é conhecida como descolamento da retina (DR) (KOZART, 1979)

Conceitualmente, DR é o acúmulo de fluido no espaço virtual entre a retina sensorial e o epitélio pigmentado da retina (EPR). No DR regmatogênico, o líquido proveniente da cavidade vítrea tem acesso a esse espaço através de uma rotura da retina.

1.2 - Descolamento de retina

Antes da invenção do oftalmoscópio, o DR era observado apenas histologicamente (WARE, 1805) ou pela alteração do reflexo vermelho do fundo de olho (CUMMING, 1846). Após a invenção do oftalmoscópio por HELMHOLTZ em 1850, apareceram várias teorias sobre a patogenia do DR. Observou-se que as roturas e a tração do vítreo sobre a retina são as responsáveis por essa alteração.

COCCIUS, em 1853, descreveu pela primeira vez o DR. Em 1854, von GRAEFE descreveu as roturas retínicas e o curso natural do DR regmatogênico.

Em 1870, DE WECKER e JAEGER supuseram que o líquido sub-retínico (LSR), oriundo do humor vítreo, seria responsável por alguns casos de DR. Mas foi LEBER (1882) quem provou definitivamente que as roturas da retina eram as causas do DR.

Em 1882, LEBER provocou DR em animais colocando fragmentos de metal no corpo vítreo e foi o primeiro a acreditar que as roturas eram secundárias à tração do vítreo, responsável pelo DR.

Introduzida a oftalmoscopia indireta em 1852 por RUETE e inventado o oftalmoscópio binocular indireto (OBI) em 1861 por GIRARD-TEULON, Gonin não lhes dava a devida importância, preferindo o uso do oftalmoscópio direto (GONIN, 1921). Somente em 1947, com o OBI modificado por Schepens (SCHEPENS, 1947), que apresentava iluminação e sistema óptico adequados, o examinador passou a ser capaz de observar a periferia da retina com estereopsia.

Com o aperfeiçoamento do OBI e com a depressão escleral idealizada por TRANTAS em 1900, os cirurgiões de retina passaram a encontrar maior facilidade no tratamento das roturas e alterações vítreo-retínicas, tanto pré como per-operatoriamente. O corpo vítreo e a anatomia vitreoretínica podem ser melhor avaliados através da biomicroscopia com a lente de três espelhos (GOLDMAN, 1954) ou lente panfundoscópica .

Em casos nos quais há opacificação dos meios transparentes, outros métodos propedêuticos são necessários para o diagnóstico das alterações vítreo-retínicas como eletro-retinografia (BROWN, 1968, PEN & HAGINS, 1969), registro do potencial visual evocado (HIROSE et al, 1979), ultra-sonografia (COLEMAN et al, 1977) e “Scanning Laser Ophthalmoscopy” (TIMBERLAKE et al, 1982; SUNNESS et al, 1995).

1.2.1 - Tratamento do descolamento da retina

O tratamento do DR consiste em reposicionar a retina no seu lugar original, isto é, em contato com o EPR e a coróide. O principal objetivo é fechar o buraco da retina e aproximar a retina descolada do EPR. A oclusão da rotura impede a passagem do líquido da cavidade vítrea para o espaço sub-retínico. Se todas as roturas da retina forem tratadas, o líquido sub-retínico é reabsorvido e a retina se aplica espontaneamente. A reaproximação dessas duas camadas pode ser obtida pelo deslocamento da parede ocular e do EPR em direção à retina, por meio de introflexão escleral ou, alternativamente, pelo deslocamento da retina em direção à parede ocular por meio da drenagem do líquido sub-retínico (LSR) ou da injeção de gás (GONIN, 1921).

A cirurgia do DR era fadada ao insucesso antes de Gonin (GONIN, 1921), que demonstrou a necessidade de selar as roturas.

O líquido sub-retínico era observado em todos os casos de DR e era drenado através de uma esclerectomia posterior. WARE, em 1805, foi o primeiro cirurgião a realizar esse tipo de cirurgia.

Em 1863, von GRAEFE descreveu a técnica de puncionar a esclera e realizar incisões na retina, pois acreditava que o LSR saia pela retinotomia.

Em 1899, DEUTSCHMANN foi o primeiro a usar o galvanocautério para puncionar a esclera perto da rotura, mas não foi levado em consideração, pois na época não se dava muita importância às roturas da retina.

Em 1863, von GRAEFE, com a ajuda de uma agulha, tentou eliminar as trações do vítreo para ocasionar a adesão corio-retínica.

LAGRANGE, em 1912, após drenagem do líquido sub-retínico, tentou aumentar a PIO fazendo três fileiras de cauterização, circundando o globo ocular logo atrás do limbo.

MÜLLER, em 1903, tentou reduzir o tamanho do globo ocular fazendo ressecção escleral. Acreditava que o alongamento da retina era responsável por DR e a ressecção da esclera reduziria a tensão da coróide.

Apesar dos vários procedimentos para o tratamento do DR, o sucesso cirúrgico era insignificante antes dos trabalhos de Gonin (DUFOUR, 1906). Em 1912, VAIL convidou 460 oftalmologistas americanos e, desses, 281 atenderam ao convite. Reportaram que cada um havia diagnosticado cerca de 5 pacientes com DR antes do encontro e 250 convidados afirmaram que não obtiveram sucesso no tratamento do DR. Os 31 restantes relataram que curaram 41 olhos. Metade dos casos não foram convincentes e, dos 20 curados, 2 eram DR por

toxemia gravídica. Vail concluiu, na ocasião, que a porcentagem de cura era de 1 para 1000 casos.

Em 1906, JULES GONIN determinou as diretrizes para o tratamento do DR. Ele identificou corretamente as roturas da retina como ocasionadoras do DR e foi o primeiro cirurgião que drenou o LSR e selou a rotura por ignipunção, provocando adesão cório-retínica. Sua técnica cirúrgica para DR continua sendo usada até os dias atuais, com algumas modificações.

Existem outras maneiras de provocar adesões cório-retínicas, como o procedimento de GUIST-LINDNER (1931), que consiste na cauterização química da parede da coróide onde se localizam as roturas. Na mesma época, LARSON (1932), WEVE (1932) e SAFAR (1932) introduziram a diatermia para tratamento das roturas da retina. Esta técnica minimizou as complicações. BIETTI, em 1933, usou dióxido de carbono para criar adesão cório-retínica (criopexia).

Com o moderno oftalmoscópio binocular indireto (OBI), idealizado por SCHEPENS (1947), iniciou-se a nova era para observação da retina. A visão estereoscópica associada à depressão escleral corrigiu os erros da oftalmoscopia indireta e da oftalmoscopia monocular indireta (OMI).

Em 1949, CUSTODIS realizou a primeira operação com explante escleral, com a finalidade de identificação. A rotura era tratada com diatermia sobre a esclera e uma peça cilíndrica de material sintético (poliviól) era usada para identificação.

Em 1965, LINCOFF et al modificaram o método cirúrgico de Custodis. Trocaram o poliviól por esponja de silicone para identificação escleral

com objetivo de selar as roturas, melhoraram a agulha para sutura escleral e trocaram a diatermia por criocoagulação.

Em 1957, SCHEPENS et al publicaram a clássica cirurgia que consistia na localização da rotura, delaminação escleral e diatermia e a técnica denominada “scleral buckling ”. Os métodos cirúrgicos de Custodis e de Schepens continuam com grande aceitação até os dias atuais.

Em 1958, ARRUGA relatou o uso de fio não absorvível, como cerclagem na altura do equador, após tratamento da rotura com diatermia e drenagem do LSR. Esse procedimento foi muito usado na Europa, mas ocorria rápida erosão transescleral, o que levou ao abandono da técnica.

Existem outras técnicas para a cirurgia do DR, como balão inflável epiescleral (LINCOFF et al, 1979) e retinopexia pneumática (RP) associada a crioterapia ou fotocoagulação da rotura (HILTON &GRIZZARD, 1986; HILTON et al, 1987). Nos casos mais complicados, deve-se associar a vitrectomia.

1.3 - Vitrectomia

A associação de alterações do vítreo com DR regmatogênico foi reconhecida logo após a invenção do oftalmoscópio. Graefe (von GRAEFE, 1863) e Deutschmann (DEUTSCHMANN, 1913) afirmavam que era necessário o corte das membranas do vítreo para o tratamento do DR. Mas, a cirurgia do vítreo só teve importante desenvolvimento a partir da década de 60, quando o vítreo pôde ser manipulado e excisado, época ainda na qual a perda do vítreo era considerado um grande desastre na cirurgias de catarata.

Nessa época, David Kasner (KASNER, 1969) procurava cortar o vítreo com tesouras e pinças com auxílio de esponjas de silicone através de uma ampla abertura escleral ou ceratotomia total (“open-sky approach”) principalmente nos traumatismos penetrantes severos e nas facectomias com perda do vítreo. Muitos colegas duvidaram desse procedimento, até que, em 1968, KASNER et al relataram a remoção total do vítreo num paciente com amiloidose primária do vítreo, obtendo bom resultado.

Robert Machmer, o primeiro cirurgião a realizar a vitrectomia por via pars-plana, em 1971, descreveu, com a colaboração de colegas, toda a metodologia referente à moderna microcirurgia do vítreo. A vitrectomia foi usada em casos selecionados de doenças do segmento posterior. Com ela, minimizaram-se as alterações no segmento anterior, manteve-se o controle da PIO e retiravam-se tecidos alterados do vítreo.

Para a vitrectomia, são necessários instrumentos especiais, como microscópio cirúrgico, vitreófago com todos os acessórios como endoiluminação, vitreótomos, pinças e tesouras especiais, além das lentes de contato. Além disso, necessitam-se de endodiatermia, endofotocoagulador, endocrino-coagulador e bombas para trocas fluido-gás e gás-líquido.

No Brasil, SUZUKI et al, a partir de 1976, iniciaram as primeiras microcirurgias do vítreo com instrumentais desenvolvidos pelo próprio autor, obtendo bons resultados (SUZUKI, 1976, 1977, 1982, 1989, SUZUKI et al, 1982, 1982). A vitrectomia é atualmente usada em vários tipos de DR complicados que não podem ser tratados através de retinopexias com explantes esclerais.

1.4 - Retinopexia pneumática: Hexafluoreto de Enxofre (SF 6)

Retinopexia pneumática (RP), termo introduzido por HILTON em 1986, é usada para o tratamento de DR regmatogênicos. Uma bolha de gás expansível é injetada na cavidade do vítreo e o paciente é posicionado de forma que a bolha tampona a rotura e permita a reabsorção do LSR. Uma adesão cório-retínica, criada ao redor da rotura, mantém a retina posicionada e colada.

O efeito terapêutico de uma bolha de gás na cavidade vítrea baseia-se em três elementos principais: tensão superficial, força de flutuação e interrupção de correntes intra-oculares (De JUAN Jr et al, 1985). Por meio de sua tensão superficial, o gás impede o acesso de líquido à rotura retínica, interrompendo assim, o seu fluxo para o espaço sub-retínico. Esse líquido, é então removido por intermédio da bomba ativa do EPR. Por meio da sua força de flutuação, o gás comprime a retina contra o EPR e protege as bordas da rotura das correntes líquidas até a cicatrização.

OHM, em 1911, realizou a primeira injeção intra-vítrea de ar para tratamento de descolamento de retina (apud, NORTON 1973), com o intuito de empurrar a retina de volta à sua posição normal.

Somente em 1938, ROSENGREN utilizou a injeção de ar na câmara vítrea, em associação com a diatermia sobre a rotura, drenagem do LSR e posicionamento adequado do olho do paciente, obtendo sucesso cirúrgico em 21 dos 25 casos tratados. Em 1952, ROSENGREN, tratando 300 casos de DR sem rotura, com uma rotura, roturas múltiplas ou roturas maiores do que um quadrante e até diálises retínicas, conseguiu cura cirúrgica em 78 % dos casos.

CHAWLA, em 1973, preconizou retinopexia pneumática (RP) nas roturas superiores. ARRUGA (1952) preconizou o uso do ar em vários tipos de DR.

PILLAT (1957) acreditava que a injeção de ar servia para o DR inferior; o ar empurraria o vítreo para baixo, tamponando a rotura.

MACHEMER, AABERG E NORTON (1969) relataram trabalho experimental em 56 olhos de macacos, em que substituíram quase todo o vítreo por ar e posicionaram o animal de tal forma que a bolha de ar tamponasse a rotura e possibilitasse a reaplicação da retina. Obtiveram sucesso em 8 de 20, olhos com roturas entre 180 e 360 graus, e admitiram que o tamponamento com ar intra-ocular poderia auxiliar no tratamento de roturas gigantes.

Nos últimos 40 anos, grandes avanços tecnológicos ocorreram para a elucidação da patogênese e tratamento do descolamento de retina. SCHEPENS (1947) popularizou o uso do oftalmoscópio indireto com ajuda da depressão escleral, LINCOFF (1967) propôs a crioterapia, esponja de silicone segmentar e cirurgia sem drenagem do líquido sub-retínico. Vários investigadores trabalham com gás que se expande dentro do olho quando pequeno volume é injetado e permanece por mais tempo que o ar, criando um tamponamento interno, empurrando a retina em direção ao EPR até ocorrer a adesão coriorretínica.

1.4.1 - Investigações Recentes

Em 1986, HILTON e GRIZZARD apresentaram na Academia Americana de Oftalmologia os primeiros 20 casos consecutivos tratados com RP. Os casos foram selecionados e os DR uma ou mais roturas dentro de ângulo de uma hora, localizados entre 8 e 1 h do fundo de olho e sem sinais de proliferação vítreo-retínica (PVR) de acordo com a classificação de Comitê de Terminologia da Sociedade de Retina (1983). O sucesso após 6 meses de seguimento foi de 90%.

HILTON et al, em 1987, relataram a experiência conjunta de 6 cirurgiões usando RP em 100 casos, que incluíam DR com pseudofacia, afacia, DR macular, roturas maculares, hemorragia vítrea, traumatismos e descolamentos antigos. Usaram hexafluoreto de enxofre (SF₆) em 77% e perfluorocarbono (C₃F₈) em 23% dos casos. Conseguiram cura inicial em 91% deles, porém tendo recorrência em 7 casos em seguimento de 6 meses. Com a introflexão escleral, houve a reaplicação da retina em 98% dos casos. As complicações encontradas foram retinopatia vitreoproliferativa (PVR), “macular pucker” e novas roturas.

São poucos os trabalhos publicados no Brasil sobre o tema (MOTTA, 1989; ROISENBLAT & COSTA, 1992). Em 1993, UNO et al mostraram que a porcentagem de cura com a RP varia entre 50 a 90%, sendo maior o sucesso na clínica particular.

Os gases podem ser utilizados tanto no tratamento do DR simples como nos DR complexos, associados a traumatismos, PVR, retinopatia diabética, roturas gigantes da retina ou roturas posteriores (NEHEMY, 1996).

1.4.2 - Escolha dos gases

Vários parâmetros devem ser levados em conta para o tratamento do DR como tamanho, número, localização das roturas, distância entre as roturas e grau da tração vítrea. Uma pequena rotura na posição das 12h pode ser tratada com pequena bolha de gás, de pouca duração, ao passo que uma grande rotura na posição das 4h necessita grande bolha de gás, de longa permanência (TORNANBE, 1998).

O hexafluoreto de enxofre (SF₆) e o perfluoropropano (C₃F₈) são os gases mais usados na retinopexia pneumática. São gases insolúveis e de longa duração. Atraem o nitrogênio (N), oxigênio (O₂) e dióxido de carbono (CO₂) para dentro do olho, expandindo assim o volume inicial. O SF₆ pode expandir 2.5 vezes o seu volume em 48h e o tempo de permanência é de 7 a 10 dias (ABRAMS et al 1974; ABRAMS et al, 1982; LINCOFF et al, 1984).

O C₃F₈ expande 4 vezes seu volume em 96 horas e se mantém efetivo por 35 dias (LINCOFF, A. et al, 1980; LINCOFF, H. et al, 1980, 1984; PARVER, 1979).

O efeito terapêutico de uma bolha de gás na cavidade vítrea é baseado em três elementos principais: tensão superficial, força de flutuação e interrupção de correntes intra-oculares (DeJUAN et al, 1985).

O ar é o gás mais utilizado para injeção intra-ocular. Outros gases freqüentemente utilizados são o hexafluoreto de enxofre (SF₆) e prefluoropropano (C₃F₈). Esses gases são incolores, inodoros, não tóxicos e quimicamente não reativos.

Para a cirurgia vítreo-retínica, o SF₆ e o C₃F₈ apresentam vantagens em relação ao ar, como expansibilidade da bolha de gás e maior permanência na cavidade vítrea. A expansibilidade da bolha de gás permite a obtenção da bolha de tamanho adequado, com a injeção de pequeno volume de gás, muito útil na RP. A vantagem da permanência prolongada permite que a retina permaneça aplicada por tempo suficiente para que uma adesão cório-retínica se forme em torno das roturas. A longevidade e a expansibilidade dos gases aumentam conforme aumenta o tamanho da cadeia de carbono. A longevidade é o tempo que a bolha de um gás necessita para desaparecer completamente do globo ocular. A vida média do gás é o tempo necessário para a bolha ser reduzida à metade do seu tamanho, a partir do tempo de sua expansão máxima. Isso é importante para o cirurgião saber quanto tempo a bolha permanecerá funcional e benéfica.

A longevidade e a vida média de uma bolha de gás intravítrea dependem de vários fatores: tipo de gás, sua concentração inicial, volume da bolha, volume da cavidade vítrea e se o olho é fático ou afático (MICHELS et al. 1990).

A expansão pós-operatória do gás de longa duração é devida principalmente à difusão do nitrogênio (N₂) para dentro do olho. A pressão parcial de N₂ nos tecidos extraoculares é maior do que na bolha de gás intraocular. Por esse motivo, o N₂ difunde-se na bolha até que a pressão parcial do gás nos dois compartimentos seja a mesma. O N₂ difunde-se na bolha mais rapidamente do que o gás de longa duração. Pode difundir fora da bolha e, dessa forma, ela se expande. A expansão máxima de uma bolha de SF₆ puro ocorre entre 24 e 48 horas após a injeção. A expansão é maior nas primeiras 6

horas após a injeção e, após a expansão máxima, a bolha decresce, lembrando uma curva exponencial (MICHELS et al, 1990; CHANG, 1994).

Deve-se lembrar de que ao injetar gás intraocularmente durante anestesia geral, haverá a interação do gás com o agente anestésico. O óxido nítrico (NO_2), comumente usado durante a anestesia geral, difunde-se rapidamente na bolha intra-ocular, aumentando o seu volume e podendo causar elevação da pressão intra-ocular (PIO). O NO_2 é rapidamente eliminado do organismo por via pulmonar. Assim, é necessário descontinuar o seu uso pelo menos 15 minutos antes da injeção do SF_6 . Entretanto, se o NO_2 se equilibrar com o gás na bolha intra-ocular durante a cirurgia, o tamanho da bolha poderá diminuir rapidamente, quando a inalação do NO_2 for suspensa, devido à saída dos gases da bolha, o que poderá causar hipotensão ocular (MICHELS et al, 1990).

Uma consideração importante no pós-operatório é o efeito da despressurização atmosférica sobre a bolha de ar. A PIO medida pela tonometria representa a diferença entre a PIO absoluta e a pressão atmosférica externa. Viagens aéreas, enquanto uma bolha de gás está presente no interior do globo ocular, podem causar a elevação da PIO. É recomendável que os pacientes não viajem por via aérea se a bolha ocupar mais de 0.6 ml da cavidade vítrea. (LINCOFF et al, 1989)

1.4.3 - Seleção do paciente para retinopexia pneumática

A retinopexia pneumática requer cooperação do paciente. HILTON & GRIZZARD (1986) recomendam o posicionamento adequado da cabeça

mantido por período que varia de 16 horas a 5 dias. O importante é manter a bolha do gás até a rotura fechar e criar a adesão corio-retínica.

A RP está contra-indicada em crianças, retardados mentais, pacientes com artrites, alterações cardiopulmonares e falta de motivação, assim como em indivíduos que necessitam viajar de avião acima de 4000 pés, pois o gás expande-se em altas altitudes. (DIECHERT et al, 1986). Conjuntivites, blefarites ou infecções das pálpebras não são contra-indicações se o paciente necessitar de cirurgia. São contra-indicações glaucomas severos, estafilomas e cirurgias recentes bem, como lentes intra-oculares mal posicionadas ou instáveis (TORNAMBE, 1988).

1.4.4 - Tipos de descolamento de retina

A maioria dos autores selecionam os olhos para a RP quando apresentam rotura ou roturas situadas dentro de uma área de 30° (1 hora) (HILTON, 1986; 1987).

Trabalhos mais recentes sugerem que descolamentos de retina associados a várias roturas nos 2/3 superiores da retina podem ser tratados com a retinopexia pneumática (Mc ALLISTER et al, 1987; TORNANBE, 1987). Naturalmente, olhos com DR regmatogênico inferior com roturas entre 4 e 8 h, têm prognóstico pobre, pois é difícil posicionar adequadamente o paciente após a operação. DR associados com degeneração em treliça, membranas fixas ou história de rotura gigante no olho adelfo também contraindicam a RP.

O SF6 tem sido utilizado com maior freqüência no tratamento de DR como único procedimento, de acordo com as técnicas de DOMINGUES (1985)

HILTON e GRIZZARD (1987), ou em tratamento de descolamentos complicados ou roturas gigantes (NORTON, 1973; MACHMER e ALLEN, 1976; SABATES et al, 1981), com o objetivo de tamponar “ab interno” as roturas e possibilitar a reaplicação da retina sensorial sobre o EPR.

1.4.5 - Técnica cirúrgica (retinopexia pneumática)

A RP pode ser realizada sob anestesia tópica, subconjuntival, retrobulbar, peribulbar ou geral e a técnica mais utilizada é a idealizada por Tornambe e col. em 1989, modificada por Nehemy (NEHEMY, 1996). Consiste em:

1. Assepsia do globo ocular
2. Cório-retinopexia em torno da rotura da retina
3. Marcação do ponto escolhido para injeção, que deve estar distante do limbo 3 mm nos pacientes afácicos ou pseudofácicos e 4 mm nos pacientes fácicos, na porção mais elevada da pars plana. Injetar rapidamente 0,3 a 0,6 ml de SF₆ estéril, com agulha de insulina.
4. Remoção da agulha e cobertura imediata do local da perfuração com cotonete.
5. Rotação delicada da cabeça do paciente, de forma que a bolha de gás se desloque do ponto da injeção.
6. Observação da artéria central da retina com OBI; se a artéria estiver fechada, aguardar até 10 minutos; se a artéria não começar a pulsar, realizar paracentese da câmara anterior ou aspiração do vítreo.
7. Instilação de cicloplégico, antibiótico tópico e oclusão do globo ocular.

1.4.6 - Vantagens e desvantagens da Retinopexia Pneumática

A RP é um procedimento relativamente fácil. O DR é tratado em 2 tempos: crioterapia focal e injeção do gás. A evolução pós-operatória é mais simples para o médico e o paciente do que nas cirurgias tradicionais.

Não necessita de explantes ou implantes de silicone, mantendo assim a anatomia do bulbo ocular, minimizando o astigmatismo e miopia no pós-operatório.

O posicionamento adequado da cabeça é difícil após a operação, principalmente nos pacientes com artrite, e pode provocar alterações psíquicas durante o repouso.

A RP por ser procedimento ambulatorial, apresenta menor custo, menor risco no ato operatório e não necessita de anestesia geral (BONOMO et al. 1996).

1.4.7 - Toxicidade do SF₆

Até hoje, poucos estudos experimentais foram realizados quanto ao efeito do hexafluoreto de enxofre (SF₆) sobre a retina e o vítreo. VYGANTAS et al (1973), em estudo experimental, tentaram encontrar um gás não tóxico como substituto do vítreo, que fosse reabsorvido mais lentamente do que o ar. O ar, o neônio, o argônio, o kriptônio, o xenônio, o SF₆ e o octafluorociclobutano (C₄F₈ ou freon- 318) foram injetados em olhos de coelhos. Não encontraram nenhuma evidência de reação inflamatória ou tóxica, por meio de oftalmoscopia ou histologia, nos 2 olhos em que foram utilizados o SF₆ e o C₄F₈ no vítreo. Constataram que, até o 3º dia pós-operatório, o SF₆

estava presente nos olhos injetados e que o tempo médio de permanência do gás foi de 4,7 dias.

FINEBERG, MACHMER, SULLIVAN, NORTON, HAMAKI e ANDERSON (1975) testaram o SF6 em olhos de macacos e verificaram que o gás permanência na câmara vítrea por 10 a 11 dias (o dobro de tempo de permanência do ar no vítreo). Observaram que o cristalino se opacificava em contato constante com o SF6 e, através de eletro-retinografia e histologias, constataram que este gás era, assim como o ar, atóxico para a retina.

Em 1992, YAMANE et al evidenciaram, através de microscopia óptica e eletrônica, em 6 olhos de coelhos submetidos a vitrectomia e injeção de SF6. lesões dispostas aleatoriamente nas hemi-retinas superiores e inferiores, lesões também encontradas nos olhos-controle. Os autores supuseram que as lesões fossem artefatos gerados durante os procedimentos histológicos e concluíram que o SF6 intra-vítreo provavelmente não representa fator de lesão retinica.

1.4.8 - Complicações da Retinopexia Pneumática

1. Gás no espaço sub-retínico
2. Gás no espaço sub-pars plana
3. Novas roturas
4. Descolamento iatrogênico da mácula

1.5 - Líquidos perfluorocarbonados

Líquidos perfluorocarbonados (LPFC) são compostos sintéticos fluorinados, que contêm ligações carbono-fluorinado. Têm grande capacidade de transporte e liberação de O₂ e CO₂. Assim, os LPFC foram usados inicialmente como substitutos do sangue, capazes de transportar gás em seres humanos e animais (CLARK & GOLLAN, 1966; GEYER, 1973,1982). Hoje são usados na angioplastia coronariana e para levar O₂ para miocárdios isquêmicos (RUDE et al, 1984). Os LPFC são usados na medicina como substitutos do sangue, para perfusão de órgãos e auxílio no diagnóstico por imagem. Os LPFC puros têm sido considerados biologicamente inertes (BERROCAL et al,1987; BIRO et al 1987; CLARK et al, 1966). A toxicidade dos LPFC é freqüentemente causada por compostos que contêm hidrogênio e ligações de carbonos insaturados. Dentre as impurezas, encontramos os compostos com ligações que contêm nitrogênio. Estes são os mais tóxicos (SPARROW et al, 1990). Também são tóxicos os compostos que contêm fluoreto de hidrogênio. A purificação dos LPFC é feita com a remoção destes compostos (FALCO et al. 1992).

Em 1966, CLARK usou os LPFC como agentes transportadores de O₂ e como substitutos do sangue.

HAIDT et al. em 1982, usaram pela primeira vez os LPFC como substitutos do vítreo e Clark (1984) advogou o uso dos LPFC antes e depois de operações vítreo- retínicas.

Em, 1984 ZIMMERMAN e FARIS descreveram o uso dos LPFC durante o ato cirúrgico para reposição de retina descolada experimentalmente

na região inferior de olhos de coelhos. Conseguiram reposicionar a retina descolada e concluíram que os LPFC são úteis nos DR com roturas inferiores.

Há vários trabalhos que demonstram que o olho não aceita bem os LPFC quando injetados na cavidade vítrea (CHANG et al, 1991; CHANG, 1987; MIYAMOTO et al.1984, 1986; WILSON et al, 1994).

As propriedades químicas e físicas que fazem com que os LPFC sejam usados como substitutos temporários do vítreo incluem boa tensão superficial no meio aquoso, alta densidade, baixa viscosidade e boa transparência (BERROCAL et al. 1994).

Os LPFC são colocados no olho no sentido póstero- anterior, isto é, são injetados sobre o disco óptico e, por ação hidrocínética, levam a retina descolada para o EPR. O líquido intravítreo é forçado a sair através da esclerectomia, enquanto o LSR sai pelas roturas retínicas para a cavidade vítrea (PEYMAN et al, 1995).

Os LPFC têm densidade maior que a água. A sua imiscibilidade em água, óleo de silicone ou sangue facilita a manipulação pelo cirurgião durante a vitrectomia (PEYMAN et al, 1995).

Quando as membranas vítreas anteriores são removidas da superfície da retina, os LPFC estabilizam a retina posterior, diminuindo o risco de lesões iatrogênicas (formação de roturas). Não se necessita nenhuma lente de contato especial durante a cirurgia, pois seu índice de refração é semelhante ao da solução salina (CHANG et al, 1988). A baixa viscosidade dos LPFC facilita sua injeção intraocular, manipulação e remoção dos tecidos (BLINDER et al, 1991)

Clinicamente, pequenas gotas de LPFC tem sido observadas na cavidade vítrea por mais de 15 anos com aspecto aparentemente inerte (CHANG et al, 1988).

Estudos histopatológicos, em olhos de animais, revelaram que pequenas gotas de LPFC (0,1 ml) no vítreo são bem toleradas por mais de 6 meses (CHANG et al, 1991). No entanto, gotículas sub-retínicas não são bem toleradas.

1.5.1 - Líquido perfluorcarbono

Para ser um eficiente agente tampão e para que seja inerte, é necessário que a substância não provoque proliferação celular, isto é, não seja tóxica para as estruturas intra-oculares (SPARROW et al, 1990)

Os LPFC têm sido usados clinicamente como substâncias intra-oculares temporárias nas cirurgias do segmento posterior, em diferentes condições, e removidas ao final da cirurgia, enquanto a cavidade vítrea é substituída por diferentes tipos de substitutos do vítreo. Dentre os LPFC, podemos citar o perfluorooctano, o perfluorodecalina, a perfluorotributilamina (CHANG et al, 1988) e o perfluoroperhidrofenantreno (BLINDER et al, 1991). Esses LPFC, com exceção do perfluoroperhidrofenantreno, apresentam propriedades físicas semelhantes e têm se mostrado tóxicos em experimentos com animais, quando deixados no olho por longos períodos (BLINDER et al, 1991; CHANG et al, 1988, 1989; CHANG, 1987; MIYAMOTO et al, 1984; 1986). Assim, os LPFC são usados durante o ato operatório das cirurgias vítreo-retínicas e removidos geralmente no final da vitrectomia.

ECKARDT et al (1991) compararam a toxicidade intra-ocular dos LPFC e perfluoropoliéteres de alta e baixa viscosidade, injetados na cavidade vítrea após vitrectomia via pars plana. Não encontraram alteração histológica nesses olhos, após 8 horas de injeção no vítreo desses LPFC. Observou-se alteração morfológica à microscopia óptica e eletrônica a partir do 6º dia.

CHANG et al, em 1991, estudaram o perfluoro-n-octano como substituto do vítreo. Após 48 h, as estruturas retínicas estavam normais histologicamente e apresentavam pouca alteração no eletro-retinograma (ERG) escotópico. Com o uso prolongado de perfluoro-n-octano, encontraram alterações histológicas significantes, principalmente na região inferior da retina. As alterações incluíam rotura dos segmentos externos dos foto-receptores, afinamento da camada plexiforme externa e presença de macrófagos na região pre-retínica.

CHANG et al (1987), em estudo histológico de olhos de coelhos após 12 dias de injeção de perfluorotributilamine, demonstraram alterações nos fotorreceptores e presença de macrófagos no vítreo, concluindo que perfluorotributilamine é um pobre substituto do vítreo.

O uso dos LPFC em olhos afácicos, pode levar a passagem do líquido para a câmara anterior. MOREIRA et al (1992) após injeção de LPFC na câmara anterior de olhos de coelhos, notaram vacúolos de LPFC no endotélio da córnea, membranas inflamatórias retrocorneais e dano endotelial no local de contato.

O contato corneal com os LPFC por longo período torna-se danoso para a córnea (MOREIRA et al. 1992, NABIH et al, 1989). Portanto, nos olhos afácicos, os LPFC devem ser usados com muito cuidado.

Vários estudos demonstraram a toxicidade dos LPFC para a retina, obrigando sua remoção ao final da vitrectomia. (BERGLIN et al, 1993, De QUEIRÓS et al, 1992, MOREIRA et al, 1992).

BERGLIN et al (1993), após injeção sub-retínica de perfluorodecalin em 28 olhos de coelhos, notaram rotura retínica em 26 olhos e necrose retínica localizada, em 4 olhos, 4 dias após a cirurgia. Os segmentos externo e interno dos fotorreceptores estavam destruídos ou danificados no 1º dia após a cirurgia. A emulsificação do perfluorodecalin foi pouco freqüente e a vacuolização das porções da retina em contato com o líquido também foram relatadas.

1.5.2- Principais aplicações clínicas dos LPFC

Os LPFC são usados como substitutos temporários do vítreo no tratamento cirúrgico de DR complicados.

A - Retinopatia Vitreoproliferativa:

Nos pacientes com PVR que apresentam DR em “funil fechado” os LPFC facilitam a dissecação das membranas tracionais que ocasionaram o problema, principalmente na vitrectomia e retirada da membrana na periferia, mantendo fixa a retina posterior, evitando maior tração ou roturas iatrogênicas. Quando as trações são aliviadas, os LPFC reaplicam a retina ao EPR, sem necessidade de realização de retinotomia posterior para drenagem interna do LSR. Todo o líquido coletado naquele espaço migra para a parte anterior do olho, saindo pelas roturas periféricas e depois pelas esclerotomias.

B - Traumatismo Ocular:

Nos casos de traumatismo perfurante com encarceramento da retina no ferimento, muitas vezes é necessária a realização de ampla retinotomia para obter-se o resultado desejado. Nesses casos, usamos os LPFC, que auxiliam muito a cirurgia, pois além de facilitarem a retinotomia, mantém o retalho retínico aplicado ao EPR.

C - Rotura Gigante:

Os DR por rotura gigante, com retalho invertido, são de difícil tratamento. Várias técnicas foram desenvolvidas para a solução do problema, como sondas de endocriocoagulação (CIBIS, 1965), mesas cirúrgicas rotatórias (SCHEPENS et al, 1965), encarceramento da retina (SUZUKI, 1989), suturas retínicas (FEDERMAN et al, 1982) e outras técnicas de difícil realização e resultados não satisfatórios.

D - Subluxação do cristalino e LIO no vítreo:

LIU et al, em 1991, usaram com grande sucesso os LPFC para remoção de 4 cristalinos e 3 LIOs deslocadas na cavidade do vítreo.

E - Corpos estranhos intra-oculares**F - Drenagem da hemorragia supracoroídea:**

Os LPFC podem ser úteis nos casos agudos de hemorragia supracoroídea, pois aumentam a PIO e tamponam os vasos sangrantes.

G- Retinopatia Diabética Proliferativa:

Em alguns casos selecionados de PVR com DR indivíduos diabéticos, o uso dos LPFC pode ajudar na cirurgia, achatando a retina, diminuindo o sangramento do disco óptico e da retina, facilitando a endofotocagulação, com bons resultados anatômicos e visuais (LE MER, 1995)

H- Hemostasia durante cirurgia vitreoretínica

SKOLIK et al, em 1994, preconizaram o uso de LPFC para minimizar o sangramento durante a vitrectomia via pars plana, em 17 olhos de diabéticos e 3 olhos que sofreram traumatismo. Injetaram vagarosamente os LPFC sobre o nervo óptico, até que a hemorragia fosse controlada e permitisse a operação.

MOREIRA et al, em 1997, demonstraram a utilidade dos LPFC para hemostasia em casos selecionados de hemorragia vítrea durante a vitrectomia, em olhos de coelhos.

Ainda o LPFC são usados nos DR secundários a coloboma da coróide, DR com ceratoprótese, na retinopatia da prematuridade, endoftalmite e remoção de membrana neovascular subretínica (MICHELS et al, 1990).

As principais complicações pós-operatórias do uso de LPFC na cavidade vítrea são: retinopatia vitreoproliferativa, aumento da pressão intraocular, hipotonia, catarata, hemorragia no vítreo e DR (ADILE et al, 1994).

1.6 - A retina como modelo de estudo da neurotoxicidade neuronal

Embriológica e histologicamente, a retina tem características muito semelhantes às do córtex cerebral, sendo considerada uma porção anteriorizada do prosencéfalo, estando ligada ao encéfalo pelas fibras do nervo óptico (COHEN, 1980). Histologicamente, a retina é composta pelas seguintes camadas:

1. Epitélio pigmentado da retina (EPR)
2. Camada dos cones e bastonetes (fotorreceptores)
3. Membrana limitante externa (MLE)
4. Camada nuclear externa (CNE)
5. Camada plexiforme externa (CPE)
6. Camada nuclear interna (CNI)
7. Camada plexiforme interna (CPE)
8. Camada de células ganglionares (CCG)
9. Camada de fibras do nervo óptico (CFN)
10. Membrana limitante interna (MLI)

A luz faz o caminho da membrana limitante interna para EPR. A maioria das sinapses estão situadas nas camadas plexiformes e os corpos celulares nas camadas nucleares externa, interna e ganglionar. Os corpos celulares dos fotorreceptores se encontram na camada nuclear externa e, na plexiforme externa, localizam-se os axônios dos foto-receptores que fazem sinapse com dendritos das células bipolares e horizontais.

Na camada nuclear interna, mais externamente, localizam-se os corpos celulares das células horizontais e bipolares e mais internamente, as

células amácrinas. Na camada plexiforme interna, encontram-se as sinapses das células amácrinas e células bipolares com as células ganglionares, cujos corpos celulares ficam na camada ganglionar e, a seguir, seus axônios formam o nervo óptico. Na retina se encontra um único tipo de célula glial, as células de Müller (COHEN, 1980).

Na retina se localizam os mesmos neurotransmissores do sistema nervoso central (SNC), como a acetilcolina (células amácrinas e ganglionares), dopamina, noradrenalina, serotonina, histamina (células amácrinas), GABA (células amácrinas e horizontais), glicina (células amácrinas) e os AAE L-glutamato (foto-receptores e células bipolares), taurina, L- aspartato e neuropeptídeos (DAW et al, 1989; NOWAK, 1988.)

Para facilidade didática, classificam-se os neurônios da retina em três grupos funcionais: neurônios de primeira ordem (fotorreceptores), neurônios de 2ª ordem (células horizontais e bipolares) e neurônios de 3ª ordem (células amácrinas e ganglionares). O L-glutamato é o neurotransmissor dos neurônios de 1ª ordem. Os de 2ª e 3ª ordens são muito sensíveis aos AAE, com graus variados de sensibilidade, por diferirem na quantidade e subtipos de receptores que possuem. Os de 2ª ordem são mais sensíveis aos agonistas dos AAE, cainato e AMPA e menos sensíveis ao NMDA. Os neurônios de 3ª ordem são sensíveis a estes mediadores, sendo mais vulneráveis à entrada de cálcio extracelular (BLOONFIELD & DOWLING, 1985; DAW et al, 1989; MILLER & SLAUGHTER, 1988)

A grande maioria das sinapses da retina é glutamatérgica (70%) como no SNC, ficando as restantes divididas entre GABA, glicina, dopamina, acetilcolina e de outros neurotransmissores (MILLER, 1988).

1.6.1 - Aminoácidos excitatórios (L-Glutamato) e a neurotoxicidade neuronal

ROTHMAN et al, em 1986, apontam os aminoácidos excitatórios (AAE), principalmente o L-glutamato, como o mais importante agente causal da morte neuronal rápida. Ressaltam a importância dos mecanismos que alteram a homeostasia do cálcio, seu tamponamento e alterações na produção de energia (SIESJO, 1992 a, 1993).

1.6.2 - O L-glutamato como neurotransmissor envolvido na lesão neuronal isquêmica

Em 1957, LUCAS e NEWHOUSE demonstraram que a injeção subcutânea de altas doses de L-glutamato monossódico induziam à degeneração da retina em ratos recém nascidos, especialmente nas camadas de neurônios mais internas, poupando as mais externas.

OLNEY, em 1969, após administração subcutânea e oral de L-glutamato monossódico em ratos, observou degeneração neuronal em locais onde não há barreira hêmato-encefálica, como os órgãos circunventriculares. Esse autor descreveu também a especificidade molecular, as características ultraestruturais da neurotoxicidade glutamatérgica e o local presumível onde se localizariam os receptores glutamatérgicos, evidenciando que apenas substâncias mimetizadoras da ação glutamatérgica poderiam exercer as ações neurotóxicas (OLNEY, 1971, 1971, 1978). A ocorrência de aumento anormal na liberação do L- glutamato “in vivo” foi demonstrada pela primeira vez por

COUTINHO NETTO et al (1981) em ratos com hiperexcitabilidade induzida pelo implante de cobalto no córtex sensoriomotor, que era bloqueada reversivelmente, bem como as lesões neuronais subsequentes, com a perfusão do antagonista glutamatérgico aminofosfonoverato.

BENVENISTE et al. em 1984, observaram um aumento de até oito vezes na concentração extracelular do L- glutamato durante os primeiros 10 minutos de isquemia no SNC. A elevação do L-glutamato é proveniente da liberação do AA neurotransmissor, presente nos neurônios e células gliais e não do espaço extracelular. A adição de L-glutamato à cultura de neurônios do hipocampo e neurônios de retina isolada de galinha provoca um processo de edema tóxico agudo e irreversível, mesmo na ausência do cálcio extracelular, semelhante à induzida por isquemia. A lesão celular produzida pelos AAE era supostamente mediada pelo sódio e cloro, já que a substituição destes íons por outros impermeáveis à membrana celular impedia o processo tóxico excitatório mais agudo. Entretanto, algumas células ainda se degeneravam mais tardiamente e, em contrapartida, a retirada do cálcio em meio com sódio e cloro, levava a uma diminuição da degeneração neuronal nas 24 horas subsequentes, apesar da permanência do edema. (CHOI, 1987; 1988). Com estas observações ROTHMAN e OLNEY (1986,1987) postularam a teoria da toxicidade excitatória (neurotoxicidade) com uma fase rápida de edema mediada pelo sódio e uma fase tardia de lesão, cálcio dependente, com degeneração celular prolongada.

1.6.3 - Teoria da toxicidade excitatória – neuroexcitotoxicidade

A toxicidade excitatória apresenta duas fases de eventos. Uma fase rápida, onde a despolarização prolongada permite entrada de grande quantidade de sódio na célula e por sua vez, uma entrada de cloro para restaurar a eletronegatividade, em ciclos sucessivos, levando ao edema celular e por vezes à lise osmótica, independentemente da presença de cálcio. Uma fase lenta, dependente da elevação da concentração do cálcio no meio intracelular, com conseqüente perda de sua homeostasia. O cálcio que entra na célula nesta situação não o faz unicamente por canais voltagem dependentes mas, principalmente, por canais ligados diretamente aos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, tipo N-metil-D-Aspartato (NMDA), levando à ativação dos processos bioquímicos, em que o cálcio atua como segundo mensageiro (CHOI, 1987; 1988; 1993).

1.6.4 - Patogênese da toxicidade excitatória

O primeiro sinal de toxicidade excitatória induzida pelo L-glutamato é o edema da célula que, mesmo quando eliminado, não impede a lesão tardia mediada pelo cálcio. (KANAI et al, 1993).

A concentração intracelular neuronal do L- glutamato é de 10 microM (KVAMNE et al, 1985), mas a concentração extracelular é mantida em aproximadamente 0,6 microM, à custa de um eficiente sistema de transporte e compartimentalização. Sabe-se que as concentrações de 2 a 5 microM de L- glutamato são substancialmente tóxicas e o controle rigoroso destes sistemas é crucial para evitar a toxicidade excitatória.

1.6.5 - Metabolismo do glutamato

O glutamato é o aminoácido livre que apresenta maior concentração no SNC (PERRY,1982), estando envolvido na síntese de proteínas e oligopeptídeos, detoxicação da amônia (VAN DER BERG et al,1975) e na síntese do ácido fólico a partir do poliglutamato, além de ser precursor de outros neurotransmissores, como o GABA.

Os AA dicarboxílicos, L-aspartato e L-glutamato são os neurotransmissores quantitativamente mais significativos no SNC de mamíferos (JOHNSON 1978; FONNUN 1984) e o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório. A ampla distribuição da glutamina nos tecidos do SNC tem sido observada desde meados da década de 70, juntamente com a sua compartimentalização e associação ao metabolismo do glutamato. A captação da glutamina nos terminais glutamatérgicos é bastante rápida; ela é realizada por um sistema de transporte saturável, podendo ser prontamente convertida em L-glutamato pela glutaminase, uma enzima que não é glia específica (BRADFORD et al, 1978).

A revisão da literatura mostra poucos estudos experimentais quanto ao efeito do SF6 e dos LPFC sobre a retina (CHANG et al, 1991; YAMANE et al. 1992). Diante disso, avaliaram-se as eventuais alterações histológicas e bioquímicas da retina de olhos de coelhos causadas pelos SF6 e LPFC.

2. OBJETIVOS

1. Avaliar o efeito do SF6 e do LPFC sobre as células retínicas (neurônios e glia) de coelhos, através da dosagem dos aminoácidos no humor vítreo .
2. Avaliar as eventuais alterações da retina de coelhos causadas pelos SF6 e LPFC, através da microscopia óptica .
3. Correlacionar os dados bioquímicos e histológicos determinados pelos SF6 e LPFC na retina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Empregamos neste estudo 15 olhos de 15 coelhos albinos da raça Nova Zelândia, com peso variando entre 2,0 e 2,5 kg, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Anestesia: os animais foram submetidos a anestesia geral, via endovenosa, com agulha tipo “butterfly” número 21. A droga usada foi thionembutal, na dose de 45 mg por quilograma de peso, injetado pela veia marginal da orelha. A técnica cirúrgica para a aspiração do vítreo e injeção do gás hexafluoreto de enxofre ou líquido perfluorcarbono foi realizada como se segue:

1. colocação do blefarostato;
2. abertura conjuntival de 0,5 cm na posição de 12 horas, a 2,5mm do limbo, paralelo a ele;
3. esclerotomia a 3,0 mm do limbo, após cauterização, prévia e passagem de ponto em “U”;
4. introdução de agulha calibre 10, montada numa seringa de insulina, sob observação direta, em direção ao nervo óptico;
5. aspiração de 0,3 ml do humor vítreo (vítreo- controle);
6. introdução, pela mesma agulha, de SF6 ou LPFC, na mesma quantidade ;
7. fechamento da esclera e da conjuntiva;
8. instilação de 1 gota de colírio com antibiótico e dexametasona.

Obs: De quatro olhos, foi removido o humor vítreo e injetado SF6 e dos outros cinco olhos, após a remoção do vítreo, foi injetado LPFC. O vítreo removido serviu de controle. Os outros seis coelhos serviram como controle.

3.1 - Remoção do vítreo tratado e do globo ocular

Após 3 semanas da injeção das substâncias, sob anestesia geral, aspirou-se o vítreo tratado com uma agulha calibre 10, montada numa seringa de insulina e encaminhados para estudo bioquímico. Os olhos foram enucleados e os animais foram sacrificados após este procedimento. Os olhos foram encaminhados para estudo histológico.

3.2 - Estudo bioquímico

Foram analisadas neste estudo os aminoácidos excitatórios aspartato, glutamato, serina, glicina, tirosina e lisina.

Análise de aminoácidos foi feita através da cromatografia de alto desempenho (HPLC) do vítreo.

Após a remoção do vítreo, ele era transferido para tubos tipo Eppendorf e congelado a -70°C , até a preparação da amostra a ser analisada. Para cada 100 μl de vítreo, adicionava-se 100 μl de metanol, agitava-se o frasco, que era mantido a 4°C por aproximadamente 1 hora, antes da centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos a 4°C . Então, 100 μl do sobrenadante era transferido para outro tubo Eppendorf e adicionavam-se 100 μl de ácido clorídrico (HCL) 0,5 M. Agitava-se e centrifugava-se como anteriormente. Dez μl do sobrenadante era transferido para outro tubo Eppendorf contendo 40 μl de HCL 0,05 M, agitava-se e transferia-se 10 μl para tubo cônico de 0,5ml, contendo 10 μl do padrão interno carboximetilcisteína (12,5 nmoles). Este frasco era acondicionado na estante do injetor automático Shimadzu SIL 9 A,

programado para adicionar 50 ul do reagente de pré-derivatização OPA, agitar e injetar 50 ul da mistura decorridos 2 minutos da adição do OPA.

3.3 - Análise histológica

Foi feita a análise histológica da retina de coelhos controle (olhos adelfos) tratados com SF6 e LPFC:

Os olhos foram enucleados e fixados em solução tamponada de formaldeído a 10% e processados para a microscopia óptica, obedecendo a seguinte rotina:

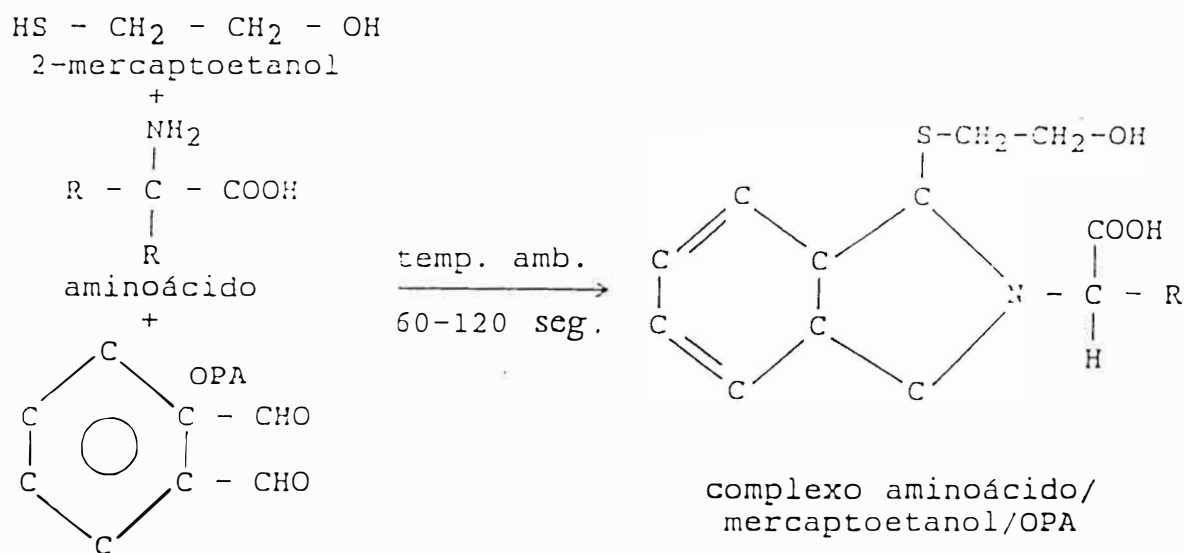
- Desidratação em soluções de álcool com concentrações crescentes de 70% até absoluto.
- Clareamento (diafanização) com solução de xilol.
- Infusionado em parafina
- Secção com micrótomo em cortes de 6 micra.
- Deparafinização
- Re-hidratação em soluções de álcool com concentrações decrescentes de absoluto até 70%.
- Coloração pelo método hematoxilina-eosina.

A análise das lâminas foi realizada com microscópio Zeiss, com lâmpada halogenada e filme “Ektachrome” ASA 64 e ASA 100 para fotos em papel.

3.4 - Análise das amostras do vítreo

Para a análise dos aminoácidos no vítreo, as amostras foram submetidas a Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) em fase reversa. Esta técnica é rápida e sensível para a análise de moléculas de massa molecular inferior a 1000 Daltons.

As análises foram feitas num cromatógrafo líquido, montado com duas bombas de alta pressão (LC-7A), sistema controlador (SLC-6B), injetor automático (SIL-6B), (todos da marca Shimadzu, detetor fluorimétrico LDC e registrador Varian). Utilizou-se coluna de fase reversa (100 X 4 mm), ODS-C 18 Hibar-Supersphere 5 mm, Merck) e pré-coluna (4 X 10 mm), compactada no laboratório com Perisorb ODS-C 18 (Merck) Na análise cromatográfica, foi utilizado o método de pré-reação com ortoftaldeído (OPA), descrito por LINDROTH e MOPPER (1979) (figura abaixo), modificado no laboratório.



Reação dos aminoácidos com OPA (ortoftaldeído). A ciclização da amina primária de aminoácidos, na presença de ortoftaldeído e mercaptoetanol, resulta em um composto fluorescente.

3.5 - Preparo das amostras para análise cromatográfica

Alíquotas de 10 microlitros do vítreo desproteínizado eram colocadas em tubos próprios para o injetor automático e misturadas a 10 microlitros de uma solução 6,25 nmoles/ml de carboxil-metil-cisteína (CMCys), que funcionava como padrão interno. O injetor automático adicionava à amostra 50 microlitros de solução de OPA (50 mg de OPA diluído em 1,0 ml de metanol, 50 microlitros de mercaptoetanol, 11,2 ml de borato de sódio 0,4 M, pH 9,5). O injetor automático homogeneizava a amostra com a solução de OPA por duas vezes e injetava 50 ml da solução por um minuto e cinquenta segundos. O padrão de aminoácidos, com o qual a amostra seria comparada, era preparado a partir de uma solução estoque de aminoácidos contendo 2,5 micromoles/ml (Pierce), acrescido de ortofosfoserina (OPS) e ácido gama-amino-butírico (GABA), na mesma concentração, diluído com cloro 0,1 N para uma concentração final de 4,16 nMoles/ml. O preparo para análise padrão era rigorosamente o mesmo da amostra a ser analisada e repetido ao início de cada série de oito análises de amostras.

A fase móvel utilizada era composta por um gradiente binário com fase A ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,025 M, pH 7,2, ajustado com HCl 0,1 N, contendo 20 ml de metanol, 20ml de acetoneitrila e 20 ml de tetrahydrofurano por litro), e fase B (solução aquosa de metanol a 65 %), que variava de 7 a 100%. Ambas as fases eram filtradas num sistema Milipore (filtros Milex de 0,45 micrômetros) e deaerados, com o auxílio de uma bomba de vácuo. Toda a água utilizada no preparo das soluções era destilada e purificada num sistema Mili Q (Milipore).

O fluxo utilizado no cromatógrafo foi de 0,7 ml/minuto, durante 60 minutos, deixando-se intervalos de 5 minutos para estabilização entre uma injeção e outra.

A quantificação dos aminoácidos estudados era feita pela seguinte fórmula:

$$[\mathbf{aa}] = \frac{h_3/h_4}{h_1/h_2} \times [\mathbf{P}]$$

Em que: [aa]- é a concentração de aminoácidos na amostra,

h1- altura do aminoácido padrão,

h2- altura do pico de Cmcys no padrão.

h3- altura do pico do aminoácido na amostra,

h4- altura do pico de CMCys na amostra,

[P]- concentração da solução padrão de aminoácidos. A concentração de aminoácidos da amostra é expressa na mesma unidade da concentração do padrão.

3.6 - Método estatístico

Para a análise dos resultados aplicou-se testes paramétricos levando-se em conta a natureza e a distribuição das medidas estudadas. Foram comparados os resultados obtidos após os dois tratamentos (SF6 e LPFC) com o grupo controle, através da análise de variância (ANOVA).

Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$; $p \leq 0,05$) o nível de rejeição da hipótese da nulidade.

4. RESULTADOS

As figuras 1, 2, 3 e 4 mostram os perfis cromatográficos representativos de análises de aminoácidos de uma amostra padrão (fig. 1) contendo 18 aminoácidos, 90 picomoles de cada um e de amostras de vítreo controle (fig. 2) e de vítreos obtidos de animais tratados com SF6 (fig. 3) e LPFC (fig. 4), cujas amostras foram previamente preparadas para análise de aminoácidos (descrito em material e métodos)

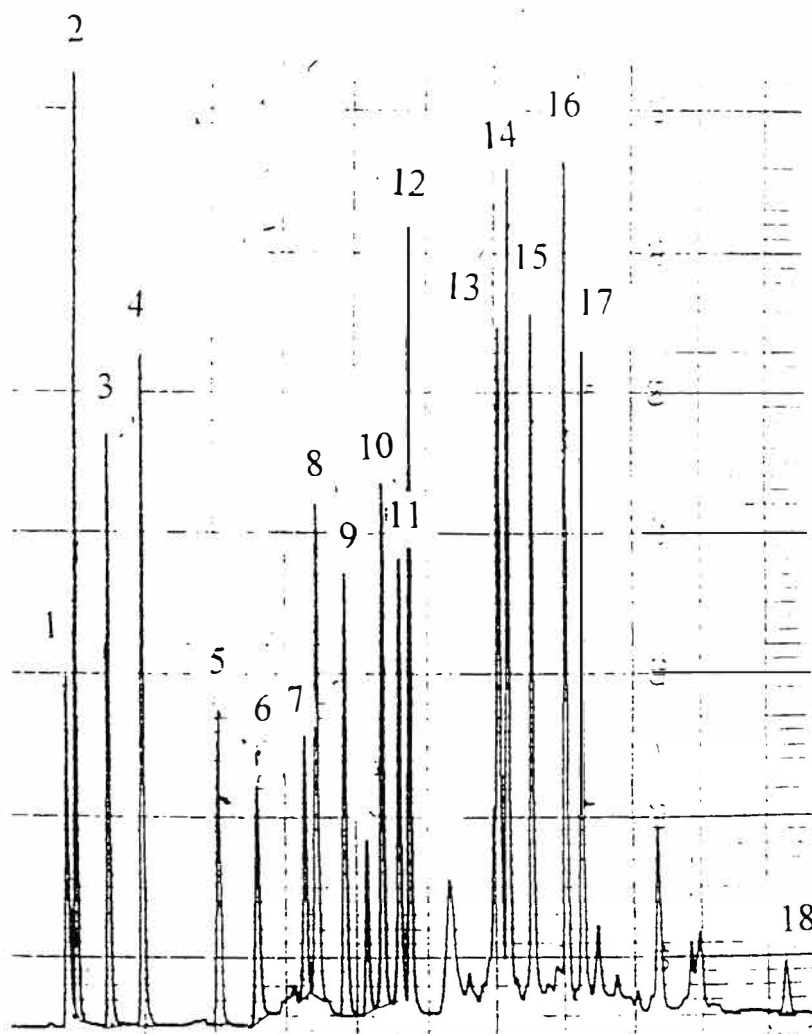


Figura 1. Perfil cromatográfico representativo da análise de 18 aminoácidos por HPLC. A cromatografia foi obtida por HPLC em coluna de fase reversa ODS-C18, 5 μ m, 100 x 4 mm, superesférica, utilizando-se pré-derivatização com OPA e gradiente de tampão-fosfato de sódio 0.35 mM (bomba A) e metanol-agua 65% (bomba B). A sequência de eluição dos aminoácidos da coluna está indicada pelos números acima dos picos: 1=ortofosfoserina; 2 = aspartico; 3= glutâmico; 4=carboximetilcisteína (padrão interno); 5= serina; 6=histidina; 7= glicina; 8= treonina; 9= arginina; 10= alanina; 11= GABA; 12= tirosina; 13= metionina; 14=valina; 15= fenilalanina; 16= isoleucina; 17= leucina e 18=lisina. A concentração de cada aminoácido era de 90 picomoles. Fluxo de 0,8 ml/minuto.

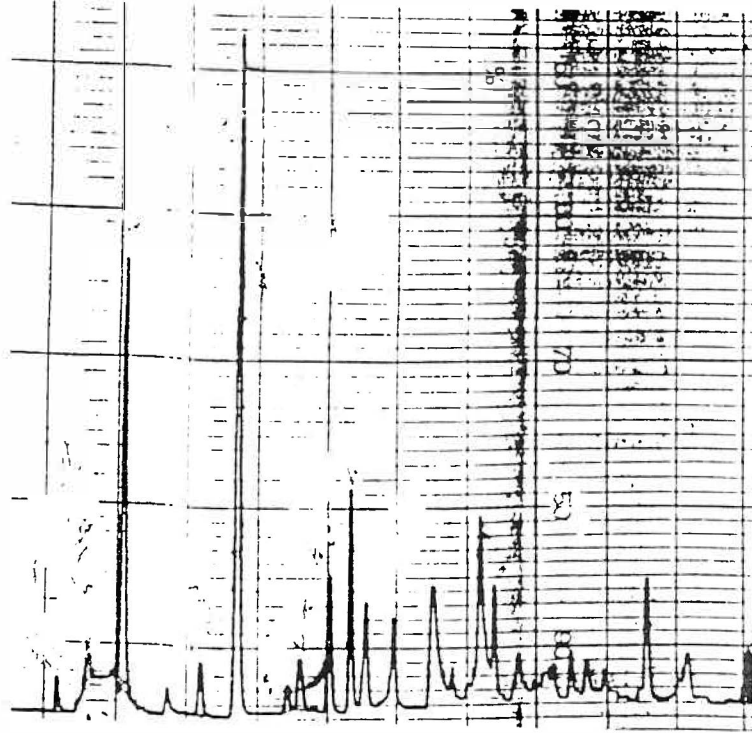


Figura 2 – Perfil cromatográfico representativo da análise de aminoácidos do vítreo controle. As condições cromatográficas foram realizadas como descrito na figura 1.

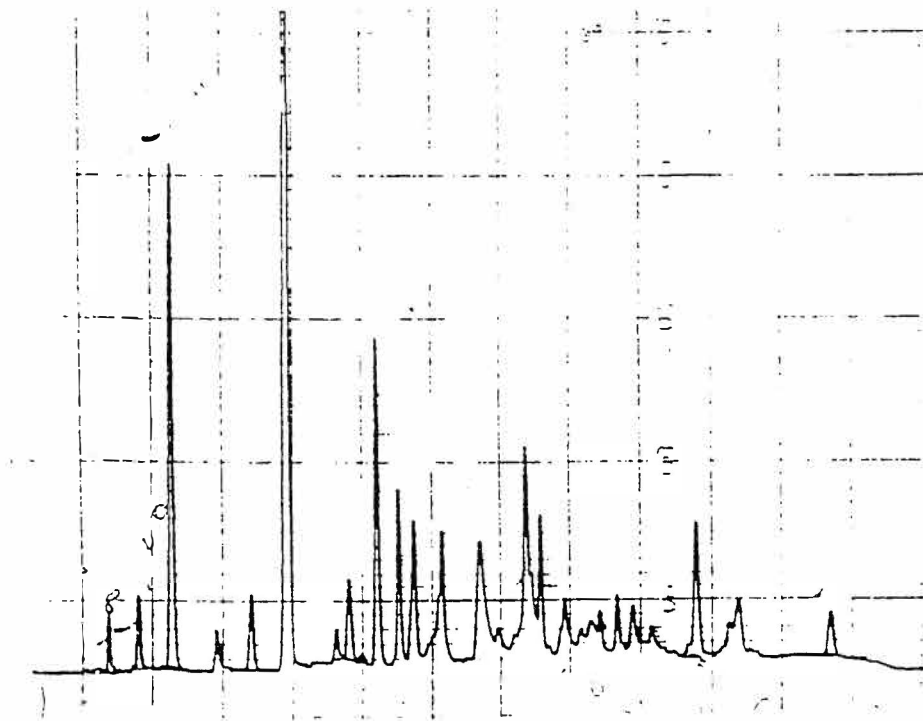


Figura 3 – Perfil cromatográfico representativo da análise de aminoácidos do vítreo de animais tratados com SF6. As condições cromatográficas foram realizadas como descrito na figura 1.

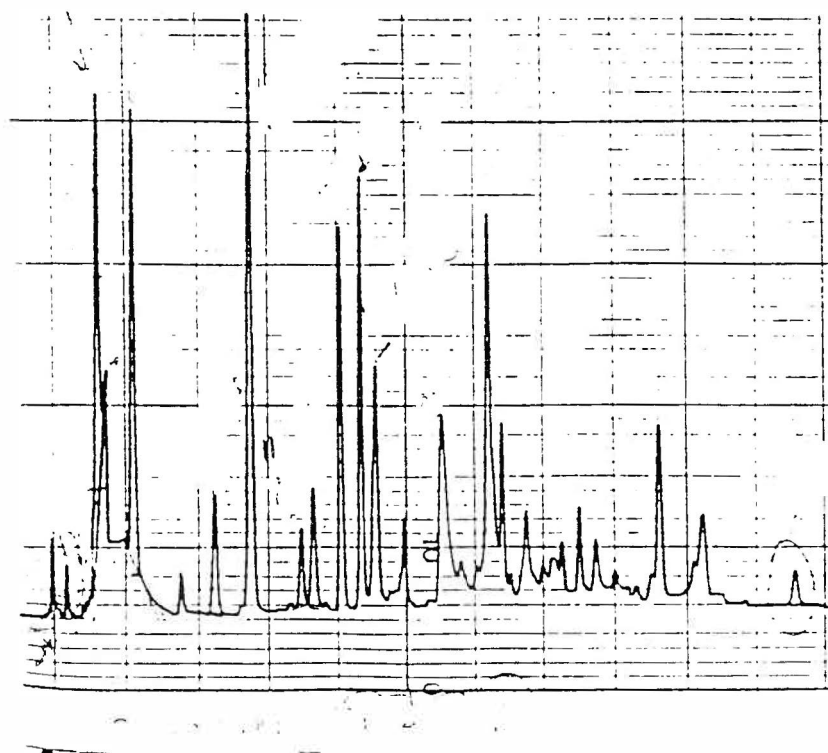


Figura 4 – Perfil cromatográfico representativo da análise de aminoácidos do vítreo de animais tratados com LPFC. As demais condições cromatográficas foram realizadas como descrito na figura 1.

A figuras 5 e 6 mostram os resultados das análises quantitativas dos amino-ácidos neurotransmissores L-glutamato e glicina, respectivamente, liberados nos vítreos dos coelhos controles e submetidos aos tratamentos com SF6 e LPFC. Como pode ser verificado na figura 5, ocorreu grande e significativo ($p \leq 0,01$) aumento da liberação do L-glutamato para o vítreo dos animais tratados com SF6 (6,8 vezes) e LPFC (18,4 vezes) em relação a liberação nos vítreo controles ($4,1 \pm 2,3$ pmoles). Observa-se também que entre os animais tratados, o maior incremento na liberação ocorreu os que foram tratados com LPFC, sendo este aumento significativo ($p \leq 0,01$) e de 2,7 vezes maior que o aumento provocado pelo SF6.

Glutamato

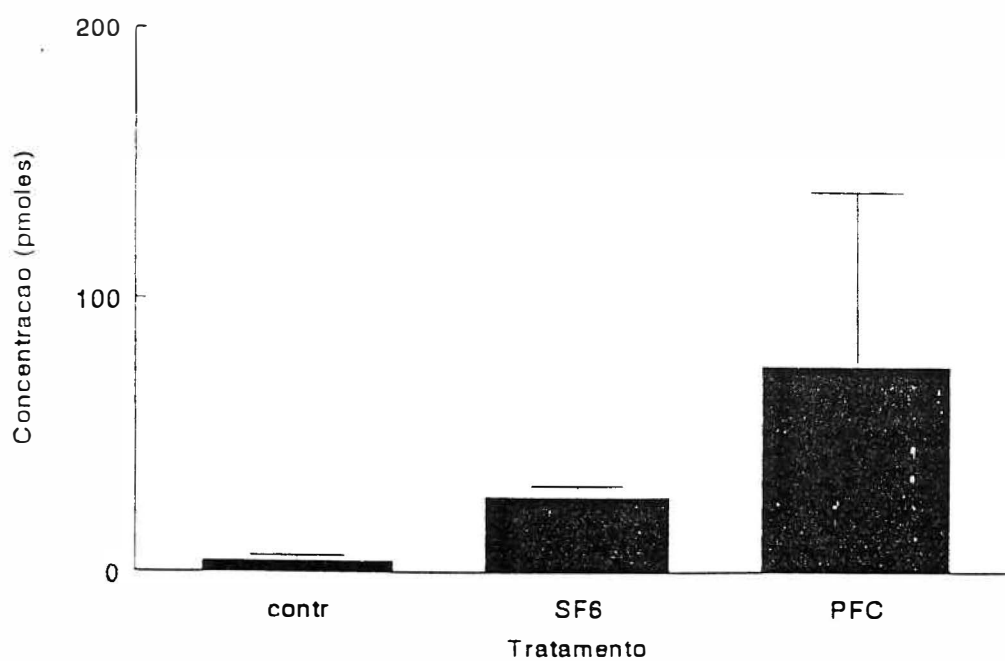


Figura 5 – Análise quantitativa da liberação de L-glutamato no vítreo de animais controles, tratados com SF6 e LPFC. A análise foi realizada como descrito na figura 1. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão de 6 análises de experimentos independentes para os controles, 4 para SF6 e 5 análises para o tratamento com LPFC.

A figura 6 mostra a liberação do neurotransmissor glicina no vítreo de animais controle e tratados com SF6 e LPFC. Observa-se nesta figura maior aumento da liberação da glicina no vítreo dos animais tratados com LPFC, embora não significativo estatisticamente.

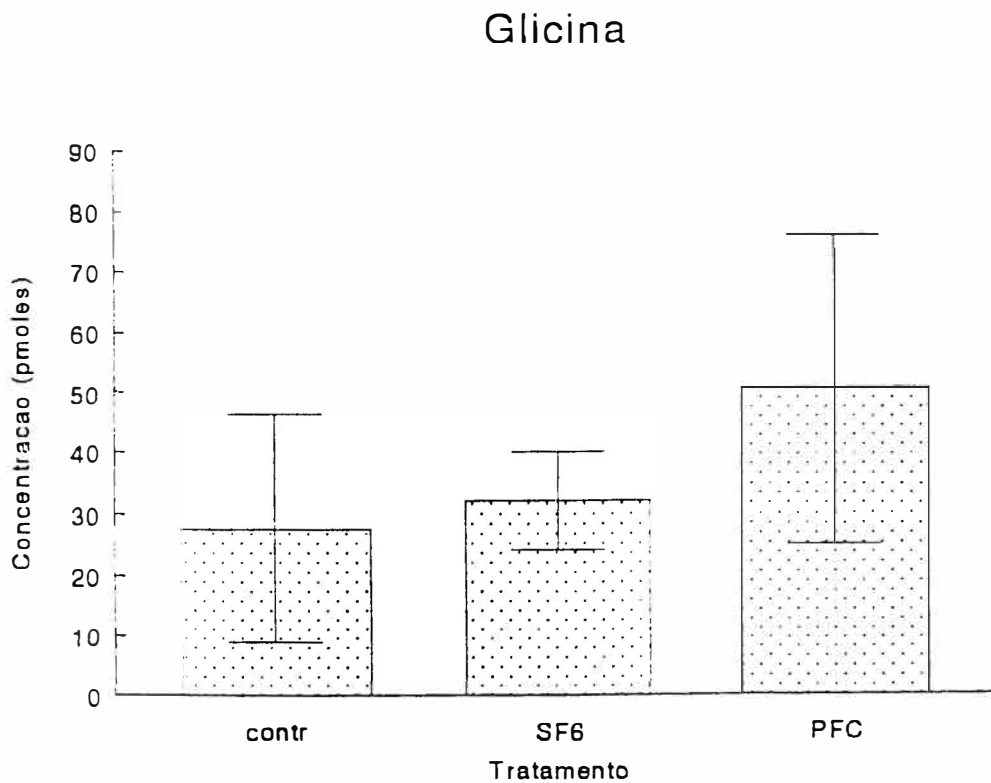


Figura 6 – Análise quantitativa da liberação de glicina para o vítreo de animais controles e tratados com SF6 e LPFC. As análises e os experimentos foram realizados ‘como descrito na figura 5.

As figuras 7, 8, 9 e 10 mostram, respectivamente, o resultado da análise quantitativa dos aminoácidos não neurotransmissores aspártico, serina, treonina e lisina. Como pode-se observar nessas figuras, não ocorreu diferença significativa na liberação destes amino-ácidos para o vítreo dos animais controles e tratados com SF6 e LPFC.

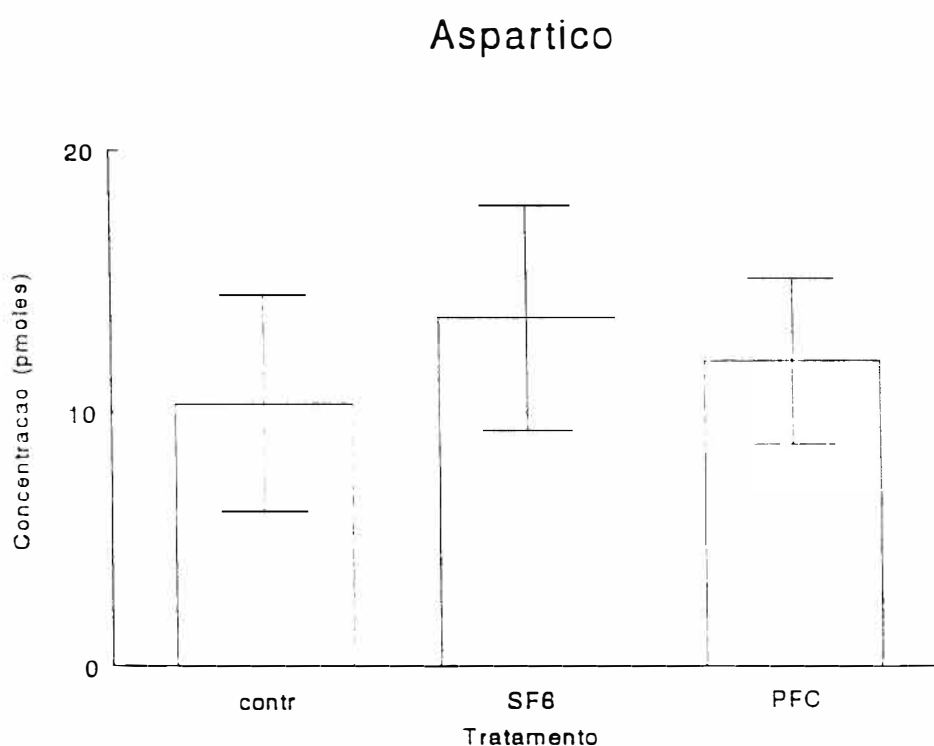


Figura 7 - Análise quantitativa da liberação de L-aspártico para o vítreo de animais controles, tratados com SF6 e LPFC. As análises e os experimentos foram realizados como descrito na figura 5.

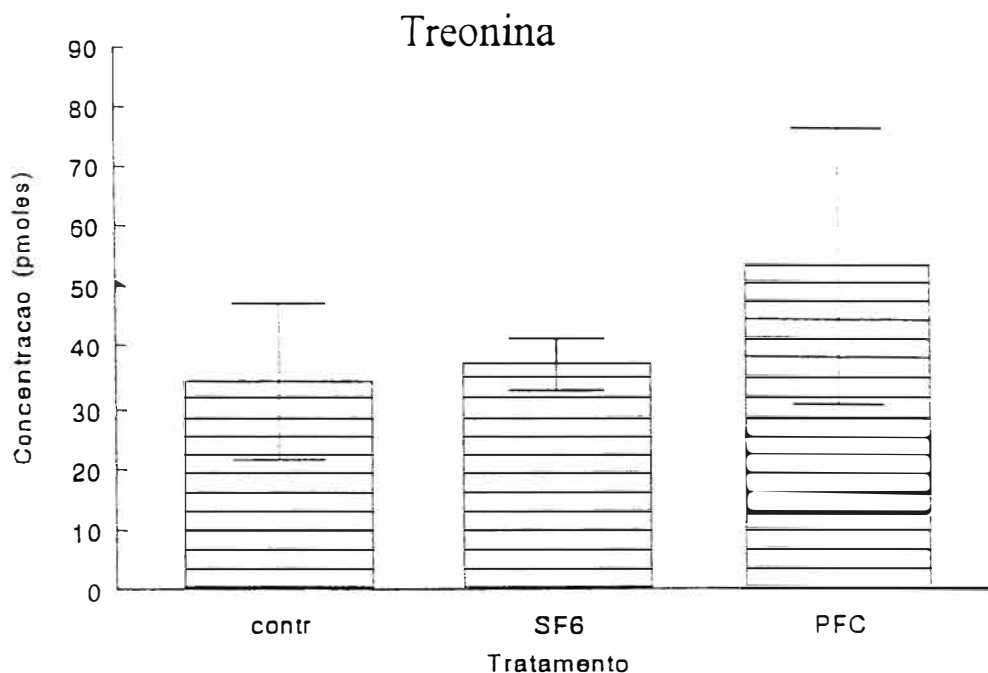


Figura 8 - Análise quantitativa da liberação de treonina para o vítreo de animais controles e tratados com SF6 e LPFC. As análises e os experimentos foram realizados como descrito na figura 5.

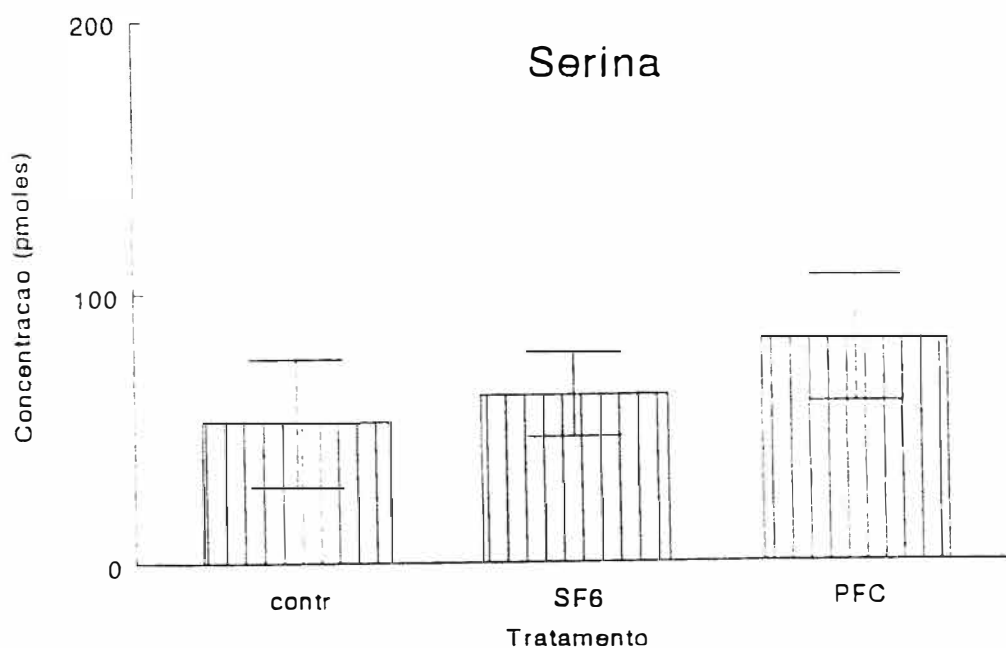


Figura 9. Análise quantitativa do aminoácido serina liberado para o vítreo de animais controles, tratados com SF6 e LPFC. As análises e os experimentos foram realizados como descrito na figura 5.

Lisina

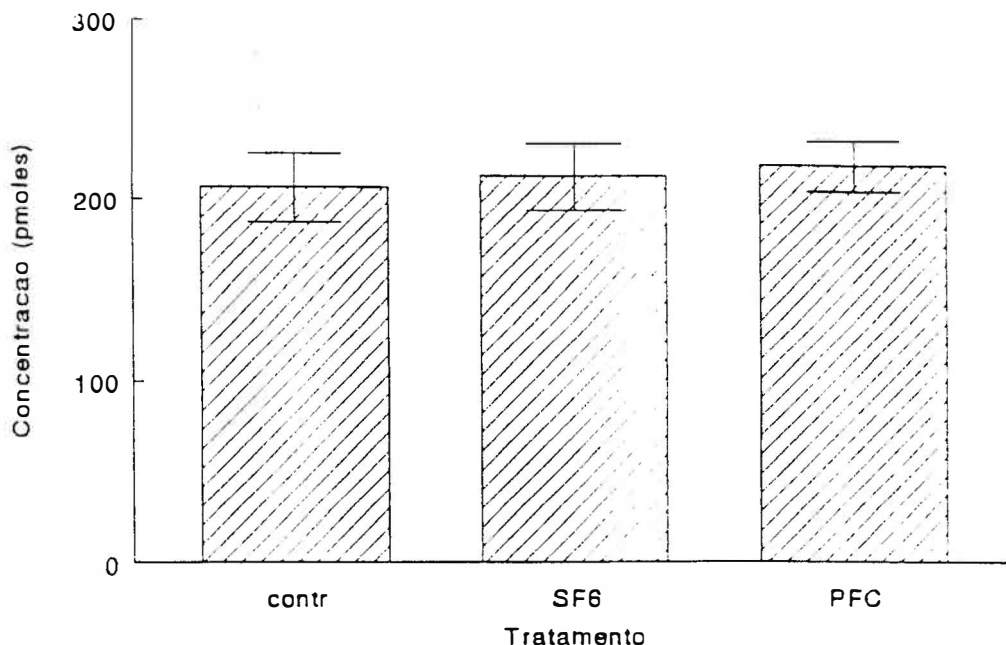


Figura 10 - Análise quantitativa do amino-ácido lisina liberado para o vítreo de animais controle e tratados com SF6 e LPFC. As análises e os experimentos foram realizados como descrito na figura 5.

É interessante ressaltar que o aumento específico da liberação de ortofosfoserina no tratamento com LPFC, observado na figura 4, não ocorreu nos controles e nos tratados com SF6. A liberação específica de ortofosfoserina e L-glutamato foram descritos por LOUZADA-JUNIOR et al. (1992) na retina de coelhos submetidos a isquemia.

A tabela 2 mostra a análise quantitativa dos aminoácidos no vítreo dos coelhos normais e tratados com SF6 e LPFC. Média \pm DV sendo que a análise estatística mostrou significância apenas para o L-glutamato quando compara o controle com os tratamentos (SF6 e LPFC), $p < 0,001$ e $p < 0,004$, respectivamente.

4.1 - Análise estatística

Para a análise dos resultados aplicou-se testes paramétricos levando-se em conta a natureza e a distribuição das medidas estudadas

Tabela 1 - Análise quantitativa de aminoácidos dosados no vítreo de coelhos tratados com SF6, LPFC ou dos do grupo controle.

Grupos	Asp	Glu	Ser	Gly	Thr	Lys
Controle (n=6)	14,60	3,80	41,10	29,30	43,20	211,20
	17,30	2,40	63,30	43,70	44,70	164,30
	12,70	6,30	74,70	36,80	36,50	238,00
	7,60	5,80	55,60	23,60	28,90	204,60
	16,70	1,60	48,70	21,40	24,90	188,20
	9,30	4,60	51,20	23,20	33,20	207,40
*	13,00±3,90	4,10±1,90	55,80±11,80	29,70±8,90	35,20±7,80	202,30±24,60
SF-6 (n=4)	15,98	31,86	65,41	28,93	42,05	229,38
	18,14	26,30	83,46	41,80	37,88	189,37
	11,82	22,62	49,26	34,23	31,67	226,19
	8,59	30,84	51,18	23,34	37,01	205,63
	*	13,60±4,30	27,9±4,30	62,30±15,80	32,10±7,90	37,20±4,30
LPFC (n=5)	8,22	26,23	67,19	29,77	31,47	236,02
	9,30	55,62	76,14	33,67	44,50	222,48
	15,08	50,53	62,85	27,31	37,54	202,13
	15,04	188,49	115,15	85,59	69,91	205,63
	11,82	56,55	96,76	53,49	84,62	226,19
*	11,90±3,20	75,50±64,40	82,40±23,20	46,00±24,40	53,60±22,70	218,50±14,30

Análise quantitativa dos valores das dosagens de aminoácidos, em pmoles, obtidos pelo método de Lindroth e Mopper, no vítreo de coelhos submetidos à injeção de SF-6 ou LPFC e nos grupos controles.

n = número de animais
Asp = ácido aspártico
Glu = glutamato
Ser = serina

Gly = glicina
Thr = tirosina
Lys = lisina
* = média ±desvio padrão

Podemos observar na tabela 2 que ao se comparar a dosagem dos seis diferentes tipos de aminoácidos antes (grupo controle) e após o tratamento com SF6 e LPFC do vítreo, só houve diferença estatisticamente significativa na dosagem do L-glutamato que apresentou aumento após tratamento ($p < 0,05$). Em relação à dosagem dos demais aminoácidos, não se observou diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle com os tratados com SF6 e LPFC.

Tabela 2 - Análise quantitativa dos aminoácidos no vítreo de coelhos normais e tratados com SF6 e LPFC.

Aminoácido	Controle (n=6)	SF6 (n=4)	LPFC (n=5)	Comparação Estatística
Aspartato	13,0±3,9	13,6±4,3	11,9±3,2	n. s.
L-glutamato	4,1±1,9	27,9±4,3*	75,5±64,4**	$p < 0,05$
Serina	55,8±11,8	62,3±15,8	82,4±23,2	n. s.
Glicina	29,7±8,9	32,1±7,9	46,0±24,4	n. s.
Tirosina	35,2±7,8	37,2±4,3	53,6±22,7	n. s.
Lisina	202,3±24,6	212,6±18,7	218,5±14,3	n. s.

Análise da variância: significativa apenas para glutamato – entre grupos controle, SF6 e de LPFC.

* = $p < 0,004$

** = $p < 0,0001$

As análises de aminoácidos foram realizadas como descrito na ~~figura 1~~ ^{tabela 1}. Os resultados estão expressos em pmoles ±desvio-padrão, n representa o número de animais estudados (um olho de cada animal).

4.2 - Análise histológica

As retinas tratadas com SF6 e LPFC, quando comparadas com as dos controles, mostraram intensa vacuolização da camada ganglionar, com picnose, edema e diminuição do número de núcleos. A camada nuclear interna apresentava-se edemaciada, achado este evidenciado pelo aumento da distância entre as camadas ganglionar e nuclear externa, com diminuição do número de núcleos. As camadas plexiforme interna e externa apresentavam edema e alterações na arquitetura. Discretas alterações foram observadas nas camadas mais externas.

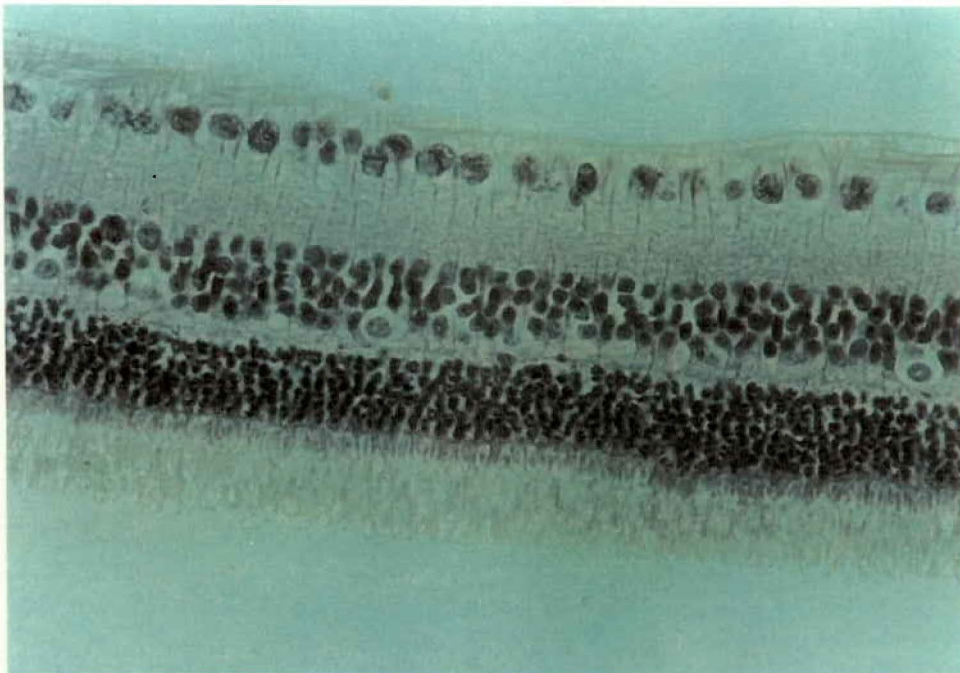


Figura 11. Aspecto histológico panorâmico da retina e coróide normais (100x).

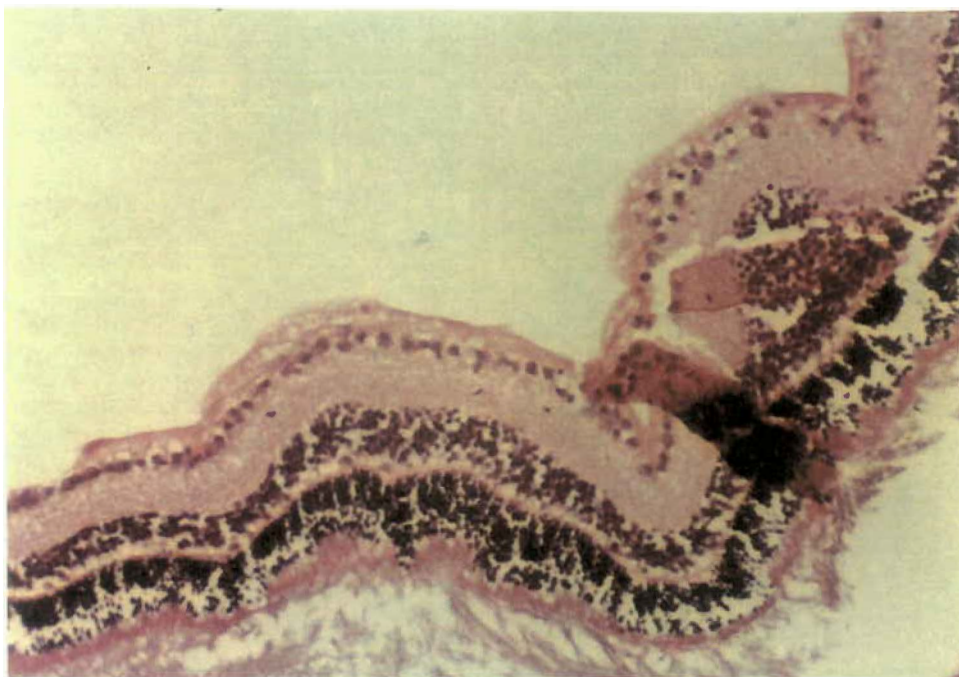


Figura 12 - Microscopia óptica da retina tratada com SF6, mostrando irregularidades nas camadas superficiais da retina, sem alterações nas camadas externas (200x).

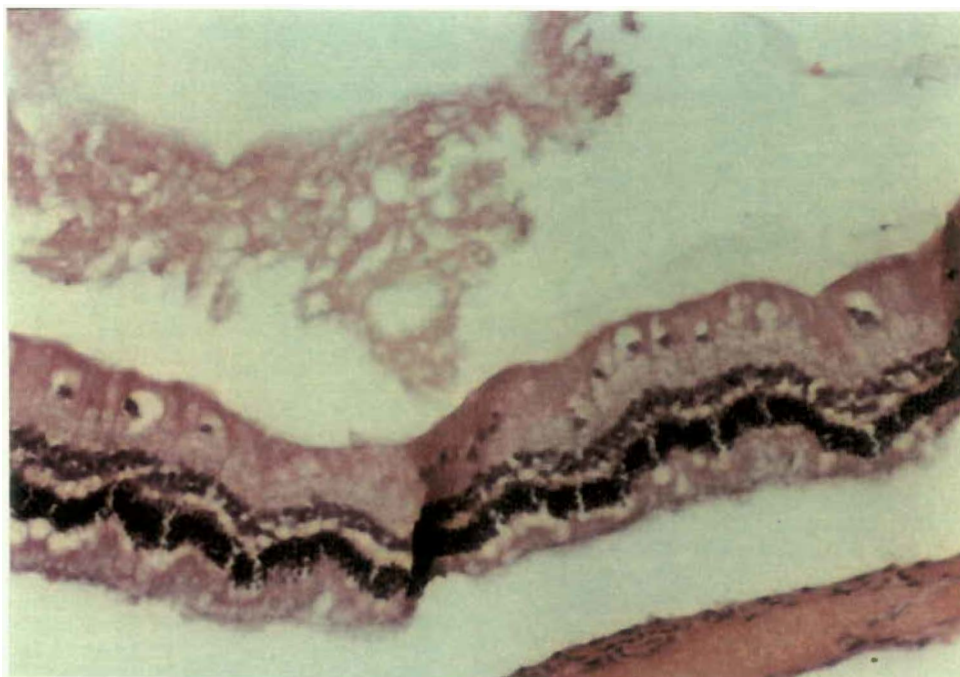


Figura 13. Microscopia óptica da retina tratada com LPFC, mostrando camada de fibras nervosas e ganglionar com diminuição de núcleos, edemaciada e desorganizada (400x).

5. DISCUSSÃO

O descolamento de retina é o acúmulo de fluido no espaço potencial entre a retina sensorial e o epitélio pigmentado da retina. No DR regmatogênico, o fluido proveniente da cavidade vítrea tem acesso a esse espaço através de uma rotura da retina. O principal objetivo da cirurgia reparadora do DR é “fechar” essa rotura, interrompendo, assim, a passagem do líquido para espaço sub-retínico. Para que a rotura seja fechada funcionalmente, é necessária a aproximação do EPR à retina sensorial, criando uma adesão corio-retínica, através da criocoagulação, diatermocoagulação ou fotocoagulação. A reaproximação dessas duas camadas pode ser obtida pelo deslocamento da parede ocular e do EPR em direção à retina, por meio de introflexão escleral ou, alternativamente, pelo deslocamento da retina em direção à parede ocular por meio da drenagem do LSR ou injeção de gás. (NEHEMY, 1996)

O SF₆ pode ser utilizado tanto no tratamento de DR simples como de DR complexos, associados a traumatismos, PVR severa, retinopatia diabética (RD), roturas gigantes da retina ou roturas posteriores. Para os casos mais simples, utiliza-se injeção intra-ocular de gás associada a fotocoagulação ou criocoagulação, procedimento denominado RP. Para os casos mais complexos, utiliza-se o gás em associação com técnicas de vitrectomia, introflexão escleral e endofotocoagulação. Na RP, o gás tampona a rotura internamente até o desenvolvimento de uma adesão coriorretínica. Nos casos de DR complexos, o gás permite a reaplicação da retina durante a operação e o tamponamento interno temporário após ela. Para a utilização de gás associada à vitrectomia é usual uma troca fluido-ar e, a seguir, a troca ar- gás na concentração desejada.

Os líquidos perfluorocarbonados são usados como substitutos temporários do vítreo no tratamento de DR complicados (PEYMAN et al, 1991); são removidos no final do ato cirúrgico, sendo a cavidade do vítreo preenchida por outros substitutos não tóxicos, como os gases ou óleo de silicone (BLINDER et al, 1991; CHANG et al, 1989; MIYAMOTO et al, 1986)

As propriedades físicas e químicas dos LPFC favorecem o seu uso como substitutos temporários do vítreo. Elas incluem boa tensão superficial num meio aquoso, alta gravidade específica, baixa viscosidade e transparência óptica (SARGENT & SEFFL, 1970)

Os LPFC são injetados no bulbo ocular em sentido pósterio-anterior, isto é, começando sobre o disco óptico até preencher a cavidade do vítreo.

Os LPFC possuem tensão superficial duas vezes maior que a água, além de ser imiscíveis com ela, com o sangue e com o óleo de silicone. Assim, o cirurgião tem facilidade em manipular de maneira atraumática os tecidos oculares durante a vitrectomia.

Devido ao peso específico alto, o LSR e o sangue são empurrados para a porção anterior da retina, sendo assim desnecessária a retinotomia para a drenagem desses líquidos nos DR regmatogênicos. Além disso, os LPFC são úteis para o tratamento das alterações que seguem abaixo:

Os LPFC usados nos PVR facilitaram bastante a separação e remoção das membranas vítreas (CHANG et al, 1988; FORLINI, 1992).

Nos casos de traumatismo ocular com severa hemorragia associada a DR, o uso dos LPFC facilita bastante a cirurgia, pois, separa o sangue do vítreo, isolando a retina e facilitando a vitrectomia. (DESAI et al, 1993)

Nos DR com rotura gigante. o resultado é pobre com tratamento convencional. Com o uso dos LPFC, muitos cirurgiões obtiveram sucessos anatômicos e fisiológicos bastante satisfatórios (KREIGER et al, 1992; GLASER et al, 1991; CHANG et al, 1989).

O uso dos LPFC facilita a remoção do cristalino, núcleo, fragmentos do cristalino ou LIO luxados na cavidade vítrea. (LIU et al, 1991; PEYMAN & SCHULMAN, 1986)

Os LPFC são usados nas hemorragias expulsivas, per- ou pós-operatóriamente (DESAI et al, 1992; REYNOLDS et al. 1993), nas vitrectomias por complicações da RD como DR tracionais (MATHIS, 1992; CORCOSTEGUI, 1992), nos DR associados a colobomas da coróide (LEE et al, 1992), no tratamento cirúrgico das ROP avançadas (MILLSAP et al, 1994) e em outras complicações vítreo-retínicas.

CHANG et al, em 1988, demonstraram que uma ou duas gotas de LPFC deixados na cavidade do vítreo não lesam as estruturas do globo ocular, mas não são bem tolerados quando se localizam no espaço sub-retínico (CHANG et al, 1991).

Vários estudos experimentais demonstraram haver intolerância quando os LPFC permanecem longo período dentro do olho (CHANG et al, 1991; CHANG, 1987; MIYAMOTO et al, 1984; WILSON et al, 1994).

ECKARD et al, em 1991, demonstraram a toxicidade dos LPFC em olhos de coelhos. Após vitrectomia, injetaram os LPFC e, após 6 dias, encontraram alterações histológicas na microscopia óptica e eletrônica.

Dados da literatura demonstraram que o contato prolongado de LPFC provocava alterações histológicas significantes na retina de coelhos, com

disrupção dos segmentos externos dos fotoreceptores, afilamento da camada plexiforme externa e presença de macrófagos na região pré-retínica. Encontraram também alterações no ERG escotópico, que persistiram mesmo após remoção do líquido (CHANG et al,1991). Por isso, deve-se remover os LPFC no final das vitrectomias. O uso de SF6 tem-se mostrado menos tóxico.

Entretanto, escassos são os dados na literatura para explicar os efeitos do LPFC e SF6 na retina quando usados cronicamente. Este foi um dos objetivos deste trabalho, ou seja, estudar quantitativamente a liberação de aminoácidos no vítreo de coelhos submetidos ao efeito do SF6 e LPFC e avaliar histologicamente as retinas tratadas e correlacionar os dados bioquímicos e histológicos.

A tabela 1 mostra a liberação de neurotransmissores aspartato, glutamato, serina, glicina, tirosina e lisina. Nota-se grande liberação de L-glutamato após 21 dias da injeção intra-vítrea do SF6 e LPFC em comparação aos do grupo controle. Não houve alteração significativa do ponto de vista estatístico com relação a liberação do aspartato, serina, glicina, tirosina e lisina. Isto, provavelmente ocorreu por não haver quebra da barreira hemato-retínica, pois nos casos em que ocorrem estes fatos, há aumento de todos os AA.

Na figura 5, observa-se grande aumento na liberação do L- glutamato no vítreo de animais tratados com SF6 e LPFC, após 21 dias da injeção intra-vítrea destas substâncias, quando comparado com os controles. As concentrações de 4,1; 27,9 e de 75 pmoles encontradas nas análises cromatográficas das amostras de vítreo controle e tratadas com SF6 e LPFC, respectivamente, como descrito em materiais e métodos, correspondem aos valores de 0,91; 6,24 e 16.8 uMolar no vítreo, respectivamente (tabela 2).

Dados da literatura mostram a neuroexcitotoxicidade do L-glutamato em neurônios do SNC (incluindo a retina) quando concentrações acima de 2 a 5 uMolar são atingidas (LUCAS e NEWHOUSE, 1954; OLNEY, 1971, 1978 e OLNEY, RHEE e HO, 1971).

O aumento da liberação de L-glutamato atingindo concentrações substancialmente tóxicas poderia ocorrer:

1. Nas situações em que ocorre falência do sistema de transporte deste aminoácido para o interior das células. Isto é realizado por proteínas transportadoras, com sistemas de alta e baixa afinidade, encontrados nas sinapses, dendritos e células gliais.
2. Em situações em que a morte celular está aumentada (neurônios e glia) e
3. Na ocorrência de falência energética por hipóxia ou anóxia ou em casos de baixa ou falta de perfusão (isquemia), ou situações de inibição da glicólise.

A análise histológica das retinas tratadas com SF6 (figura 12) e LPFC (figura 13) mostrou intensa vacuolização da camada ganglionar, com picnose, edema e diminuição do número de núcleos. A camada nuclear interna mostrava edema evidenciado pelo aumento da distância entre as camadas ganglionar e nuclear externa, com diminuição do número de núcleos. Discretas alterações foram encontradas nas camadas mais externas.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram descritos por LOUZADA-JUNIOR et al. (1992), ou seja, alterações histológicas semelhantes foram descritas em retinas submetidas a isquemia por 45 minutos bem como aumento específico da liberação de L-glutamato e ortofosfoserina (OPS).

O aumento da concentração do L-glutamato no vítreo nos animais tratados com SF6 e LPFC, atingindo concentrações da ordem de 6,24 uM e 16,8 uM respectivamente, são altamente neuroexcitotóxicas para a retina e, por si, explicariam as lesões histológicas encontradas, ou seja, induziriam a um quadro semelhante à isquemia retínica. As substâncias SF6 e LPFC poderiam estar agindo nos neurônios retínicos ou células gliais, através de qualquer uma das situações acima mencionadas: inibição do transporte do L-glutamato, toxicidade celular ou indução de falência energética (inibição da glicólise ou fosforilação oxidativa mitocondrial).

Experimentos preliminares realizados pelo Prof. Antonio Cardoso dos Santos (comunicação pessoal), na Faculdade de Ciências Farmacológicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, mostram inibição da fosforilação oxidativa induzida pelo LPFC em mitocôndrias de fígado de rato, diminuindo, portanto, a produção de ATP mitocondrial, o que explicaria a falência energética. Entretanto, novos experimentos são necessários para elucidar o mecanismo de ação dessas drogas na retina.

O L-glutamato é o mais importante neurotransmissor excitatório da retina (fotoretores e células bipolares) incluindo o encéfalo e a medula espinhal. Liberado por despolarização das sinapses glutamatérgicas, realiza sua ação através dos receptores ionotrópicos (NMDA, quisquálico/AMPA e cainato) e metabolotrópicos, ligados a proteínas G, que intermediam a síntese de segundos mensageiros (inositol trifosfato, nucleotídeos cíclicos) e liberação de cálcio intracelular. A lesão neuroexcitotóxica provocada pelo aumento excessivo do L-glutamato na fenda sináptica deve-se a aumento excessivo dos íons sódio e cálcio no interior da célula, principalmente quebra da homeostasia

do íon cálcio. Drogas que antagonizam os receptores do L-glutamato têm sido utilizadas experimentalmente como agentes neuroprotetores frente a isquemia, com resultados animadores (ZIVIN & CHOI, 1991).

A utilização de drogas potencialmente neuroprotetoras, bem como suas associações, serão alvo de investigação futura do autor, para verificar a possibilidade de proteção neuronal retínica quando da utilização dos substitutos do vítreo SF6 e LPFC.

6. CONCLUSÕES

1. Nos olhos dos coelhos tratados, houve aumento específico do L-glutamato liberado no humor vítreo, com aumento de 6,8 vezes para o SF6 e 18,4 vezes para o LPFC, em relação aos controles, atingindo concentrações altamente neuroexcitotóxicas: 6,24 e 16,8 uMolar, respectivamente (A concentração do controle foi de 0,9 uMolar).
2. As concentrações do L-glutamato dessa monta são encontradas em situações de isquemia retínica, provocando lesões nas camadas ganglionar e camada nuclear interna, confirmadas histologicamente.
3. Os resultados encontrados neste trabalho sugerem a necessidade da utilização de drogas neuroprotetoras quando os olhos forem submetidos a tratamento cirúrgico com uso do SF6 ou LPFC.

7. RESUMO

Introdução

A permanência prolongada dos substitutos de vítreo SF6 e LPFC provocam alterações histológicas significantes na retina dos olhos de coelho experimentalmente tratados, sendo o SF6 menos tóxico.

Objetivos

Procurou-se avaliar o efeito do SF6 e LPFC sobre as células retínicas dos olhos de coelhos tratados com estas drogas, analisando-se os amino-ácidos liberados no humor vítreo e as alterações histológicas da retina.

Materiais e métodos

No vítreo dos olhos de coelhos foram injetados SF6 e LPFC. Após 21 dias, o vítreo foi aspirado e os olhos enucleados, sob anestesia geral, para estudo histológico. Os amino-ácidos foram analisados por HPLC em fase reversa.

Resultados

Os olhos de coelhos tratados com os substitutos do vítreo sofreram grande aumento, específico, da concentração do L-glutamato no vítreo, em comparação com os controles normais. A análise histológica realizada por microscopia óptica mostrou na retina dos coelhos tratados disrupção dos segmentos externos dos fotorreceptores, afilamento da camada plexiforme externa e interna, diminuição do número de núcleos nas camadas ganglionar e nuclear interna, edema nestas camadas e presença de macrófagos nas camadas superficiais.

Discussão

O L-glutamato é o mais importante amino-ácido neurotransmissor excitatório do SNC e retina. Em concentrações acima de 5.0 uMolar constitui importante agente neuroexcitotóxico neuronal. O aumento específico do L-glutamato no humor vítreo dos olhos de coelhos tratados com SF6 e LPFC, atingindo concentrações da ordem de 6,24 e 16,8 uMolar, respectivamente, são altamente neuroexcitotóxicas para a retina e, por si, parecem explicar as lesões histológicas encontradas. Resultados semelhantes foram descritos quando a retina foi submetida a isquemia com ou sem reperfusão. Os resultados encontrados sugerem a necessidade da administração de drogas neuroprotetoras, quando os substitutos do vítreo SF6 e LPFC forem utilizados.

8. SUMMARY

Introduction

The prolonged use of vitreous substitutes SF6 and PFCL causes significant histological alterations in the retina of the eyes of rabbit experimentally treated, being SF6 less toxicant.

Objectives

It was tried to evaluate the effect of injected SF6 and PFCL into eyes. in the retinal cells of treated rabbits. Aminoacids released into the vitreous and the histological alterations of retina were studied.

Materials and methods

After 21 days, the vitreous was aspired and the eyes enucleated, under general anesthesia, for histological study. Aminoacids were analyzed using HPLC in reverse phase.

Results

The eyes of treated rabbits with the vitreous substitutes provoked a great increase, specific, of the concentration of L-glutamate, in relation with the released aminoacids to vitreous of the normal controls. Histological analysis accomplished by optical microscopy showed in the retina of the treated rabbits disruption of the external segments of the photoreceptors, thinning of the external and internal plexiforme layers, decrease of the number of nuclei in the ganglionar and internal nuclear layers, edema in these layers and presence of macrophages in the superficial layers.

Discussion

L-glutamate is the most important excitatory neurotransmitter of the CNS and retina. In concentrations above 5,0 uMolar, it constitutes important neuroexcitotoxic agent to neurons. The specific increase of L-glutamate in the vitreous of treated rabbits with SF6 and PFCL, reaching concentrations of the order of 6,24 and 16,8 uMolar, respectively, are highly neuroexcitotoxic for the retina neurons and for itself, they would explain the lesions found in histological studies. Similar results were described when the retina was submitted to ischemia with or without reperfusion. This results suggest the need of the administration of neuroprotectors drugs. when the vitreous substitutes SF6e PFCL are used.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, G. W.; EDELHAUSER H. F., AABERG, T. M.; HAMILTON L. H. - Dynamics of intravitreal sulfur hexafluoride gas. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **13**:863-8, 1974.
- ABRAMS, G. W.; SWANSON, D. E.; SABATES, W. I., GOLDMAN A. I. - The results of sulfur hexafluoride gas in vitreous surgery. **Am. J. Ophthalmol.**, **94**: 165-71, 1982.
- ADILE, S. L.; PEYMAN, G. A.; GREVE, M. D.; MILLSAP C. M.; VERMA L. K. WAFAPOOR H.; SOHEILIAN M. - Postoperative chronic pressure abnormalities in the vitreous study. **Ophthalmic Surg.**, **25**: 584-9, 1994.
- ANDERSON, J. R. - **Detachment of the retina**. Cambridge University Press, p. 64, Cambridge, England, 1931.
- ARRUGA, H. - Certain considerations of the surgical treatment of retinal detachment. **Am. J. Ophthalmol.**, **35**: 1573, 1952.
- ARRUGA, H. - Le cerclage équatorial pour traiter le décollement rétinien. **Bull. Mem. Soc. Fr. Ophthalmol.**, **71**: 571, 1958.
- BENVENISTE, H.; DREJER, J.; SCHOUSBOUE, A.; DIEMER, N. H. - Elevation of the extracellular concentration of glutamate in rat hippocampus during transient ischemia monitored by intracerebral microdialysis. **J. Neurochem.**, **43**: 1369-74, 1984.
- BERGLIN, L.; REN, J.; ALGVERE, P. V. - Retinal detachment and degeneration in response to subretinal perfluorodecalin in rabbit eyes. **Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, **231**: 233-7, 1993.
- BERROCAL, M. H. & CHANG, S. - Perfluorocarbon liquids in vitreous surgery. **Ophthalmol. Clin. North. Am.**, **7**:67-76, 1994.

- BIETTI, G. B. - Corioretiniti adhesive da crioapplicazioni episcleral. **Acta XIV Conc. Ophthalmol., Vol. 2**, p 12. Madrid, 1933.
- BIRO, G. P. & BLAIS, P. - Perfluorocarbon blood substitutes. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, 6:311-74, 1987.
- BLINDER, K. J.; PEYMAN, G. A.; PARIS, C. L.; DAILEY, J. P.; ALTURKI, W.; LUI, K.R.; GREMILLION JUNIOR, C. M.; CLARCK JUNIOR, L. C. - Vitreon, a new perfluorocarbon. **Br. J. Ophthalmol.**, 75: 240-4, 1991.
- BLOOMFIELD, S. & DOWLING, J. E. - Roles of aspartate and glutamate in synaptic transmission in rabbit retina. I- Outer plexiform layer. **J. Neurophysiol.**, 53:669- 713, 1985.
- BONOMO, P. P.; FARAH, M. E.; UNO, F. - Retinopexia pneumática- Estudo colaborativo de 51 casos. **Arq. Bras. Oftalmol.**, 59: 23-6, 1996.
- BROWN, K. T. - The eletroretinogram: its components and their origins. **Vision Res.**, 8:633-77, 1968.
- CHANG, S. - Low viscosity liquid fluorochemicals in vitreous surgery. **Am. J. Ophthalmol.**, 103: 38-43, 1987.
- CHANG, S. - Intra-ocular gases. In: GLASER, B. M. **Retina: surgical retina**. St. Louis, C. V. Mosby Company; 1994. V. 3, p. 2115-29. Vol. 3. cap. 131, 2115-29, 1994.
- CHANG, S.; LINCOFF, H.; ZIMMERMAN, N. J.; FUCHS, W. - Giant Retinal tears: surgical techniques and results using perfluorocarbon liquids. **Arch. Ophthalmol.**, 107: 761-6, 1989.

- CHANG. S.; OZMERT, E.; ZIMMERMAN, N. J. - Intraoperative perfluorocarbon liquids in the management of proliferative vitreoretinopathy. **Am. J. Ophthalmol.**, **106**: 668-74, 1988.
- CHANG. S.; SPARROW, J. R.; IWAMOTO, T. GERHBEIN, A.; ROSS, R.; ORTIZ, R. - Experimental studies of tolerance to intravitreal perfluoro-n-octane liquid. **Retina**, **11**: 367-74, 1991.
- CHANG. S.; ZIMMERMAN, N. J.; IWAMOTO;T; ORTIZ-R.; FARIS D. - Experimental vitreous replacement with perfluorotributylamine. **Am. J. Ophthalmol.**, **103**: 29-37, 1987.
- CHAWLA, H. B. - Intravitreal air in aphakic retinal detachment. **Br. J. Ophthalmol.**, **57**: 58-9, 1973.
- CHAWLA. H. B. & BIRCHAL. C. H. - Intravitreal air in retinal detachment surgery. **Br. J. Ophthalmol.**, **57**: 60-70, 1973.
- CHOI.D. W. -Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. **J. Neurosci.**, **7**: 369-79, 1987.
- CHOI. D. W. - Calcium mediated neurotoxicity: relation-ship to specific channel types and role in ischemic damage. **Trends Neurosci.**, **11**: 465-9, 1988.
- CHOI D. W. – Cerebral hipoxia: Some new approaches and unanswered questions. **J. Neurosci.**, **10**: 2493-501, 1993.
- CIBIS. P. A. - A cryogenic probe for intravitreal surgery. A preliminary report. **Am. J. Ophthalmol.**, **60**: 916-8, 1965.

- CLARK JUNIOR, L. S. & GOLLAN, F. - Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. **Science**, **152**: 1755-1756, 1966.
- CLARK JUNIOR, L. S.: **Description**, U. S. Patent nº 4. 490. 351, Dec. 25, 1984.
- COCCIUS, A. - In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 246.
- COHEN, I. - Retina y nervio optico In: Moses, R. - Fisiologia del ojo: aplicación clinica. Panamericana, Viamonte, Buenos Aires, 1980. p. 2165.
- COLEMAN, D. J.; LIZZI, F. L.; JACK, R. L. - Ultrasonography of the eye and the orbit. Philadelphia, Lea & Febiger, 1977.
- CORCOSTEGUI, B. - Use of perfluorocarbon liquid in vitrectomy for diabetic rhegmatogenous retinal detachment. **J Vitreo Retina**, **1**: 30-4, 1992.
- COUTINHO NETTO, J., ABDUL-GHANI, A. S., COLINS, J. F., BRADFORD, H. F. - Is the glutamate a trigger factor in epileptic hyperactivity ? **Epilepsia**, **22**: 289-96, 1981.
- CUMMING, W. - In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 245.
- CUSTODIS, E.: Scleral buckling without excision and with polyviol implant. In: Schepens, C. L. (ed).: Importance of the vitreous body in retina surgery with special emphasis on reoperations. St Louis, 1960, The C. V. Mosby Co., p. 175.

- DANTAS, A. M. - Anatomia e fisiologia. In: DANTAS, A. M. - **Doenças da retina**. Rio de Janeiro, Editora Cultura Médica Ltda, 1989. p. 1-41.
- DAW, N. W.; BRUNKEN, W. J.; PARKINSON, D. - The function of synaptic transmitters in the retina. **Ann. Rev. Neurosci.**, **12**: 205-25, 1989.
- DE JUAN JUNIOR, E.; Mc CUEN, B. W.; TIEDEMAN, J. - Intraocular tamponade and surface tension. **Surv. Ophthalmol.**, **30**: 47-51, 1985.
- De QUEIROZ, JUNIOR, J. M.; BLANKS, J. C.; OSLER, S. A.; ALFARO, D. V.; LIGGETT, P. E. - Subretinal perfluorocarbon liquids: An experimental study. **Retina**, **12 (suppl 3)**: S33-9, 1992.
- DESAI, U. R.; PEYMAN, G. A.; HARPER III, C. A. - Perfluorocarbon liquids in traumatic vitreous hemorrhage and retinal detachment. **Ophthalmic Surg.**, **24**: 537-41. 1993.
- DEUTSCHMANN, R. - In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. - Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 254.
- DEUTSCHMANN, R. - In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. - Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 300.
- DE WECKER, L. & DE JAEJER, E. - In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. - Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 246.
- DIECKERT, J. P.; O'CONNOR, P. S.; SCHACKLETT, D. E.; TREDICI, T. J.; LAMBERT, H. M.; FANTON, J. W.; SIPPERLEY, J. O.; RASHID, E. R. - Air travel and intraocular gas. **Ophthalmology**, **93**: 642-6, 1985.

- DUFOUR, M. & GONIN.J. - Maladies de la rétine. In: LAGRANGE, F., & VALUDE, E. In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 256.
- ECKARDT, C.; NICOLAI, U.; WINTER,M.; KNOP, E. - Experimental intraocular tolerance to liquid perfluorooctane and perfluoropolyether. **Retina**, 11: 375-84, 1991.
- ECKARDT,C. & NICOLAI,U. - Clinical and histological findings after several weeks of intraocular tamponade with perfluorodecalin. **Ophthalmology**, 90: 443-7, 1993.
- FALCO, L.; UTARI, S.; ESENTE, S. - Comparison of different perfluorocarbon liquids. **J. Vitreo Retina**, 1: 17-9, 1992.
- FEDERMAN,J. L.; SHAKIN,J. L.; LANNING, R. C. - The microcirurgical management of giant retinal tears with trans-scleral retinal sutures. **Ophthalmology**, 89: 832-9,1982.
- FONNUM, F. - Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **J. Neurochem.**, 42: 1-11, 1984.
- FORLINI,C- Centrifugal surgical strategy with early introduction of PFCL in the management of retinal tractional detachment: Effect on re proliferation. **J. Vitreo Retina**, 1: 44-51, 1992.
- GEYER,R. P. - Fluorocarbon-polyol artificial blood substitutes. **N . Engl. J. Med.**, 289: 1077-82, 1973.
- GEYER, R. P. - Oxygen transport in vivo by means of perfluorochemical preparations. [Editorial] **N. Engl. J. Med.**, 307: 304-5, 1982.

- GIRAUD-TEULON, M. AL. F. - In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 249.
- GLASER, B. M.; CARTER, J. B.; KUPPERMANN, B. D.; MICHELS, R. G. - Perfluoro-octane in the treatment of giant retinal tears with proliferative vitreoretinopathy. **Ophthalmology**, **98**: 1613-21, 1991.
- GOLDMAN, H. - Senile changes of the lens and the vitreous. **Am. J. Ophthalmol.**, **57**:1-12, 1954.
- GONIN, J. - Le traitement du décollement rétinien. **Ann. d'Oculist.**, **158**: 175, Paris, 1921. In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 249.
- GONIN, J. - The treatment of the detached retina by sealing the retinal tears. **Arch. Ophthalmol.**, **4**:363, 1930.
- GONIN, J. - Le traitement de décollement rétinien 1921. In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 525.
- GONIN, J. - In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 256.
- GUIST, G. - Eine neue Ablatio Operation. **Z. f. Augenhelkd.**, **74**: 232, 1931. In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 259.
- HAI DT, S. J.; CLARK JUNIOR, L. C.; GINBERG, J. - Liquid perfluorocarbon replacement of the eye. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **22 (suppl)**: 233, 1982. [Abstract]

- HELMHOLTZ, H. - Beschreibung eines Augenspiegels zur Untersuchung der Netzhaut im lebenden Auge. Berlin. A Forstner'sche Verlagsbuchhandlung, 1851. . In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 245.
- HILTON, G. F. & GRIZZARD, W. S. - Pneumatic retinopexy. A two step outpatient operation without conjunctival incision. **Ophthalmology**, **93**: 626-41, 1986.
- HILTON, G. F.; KELLY, N. E.; SALZANO, T. C.; TORNABE, P. E.; WELLS, J. W.; WENDEL, R. T. - Pneumatic retinopexy. A collaborative report of the first 100 cases. **Ophthalmology**. **94**: 307-14, 1987.
- HIROSE, T.; MIYAKE, Y.; HARA, A. - Evaluation of severe ocular trauma: electroretinogram and visual evoked response. In FREEMAN, H. M., ed. Ocular trauma. Appleton-Century-Crofts, pp. 31-52, New York, 1979.
- KANAI, Y.; SMITH, C. P.; HEDIGER, M. A. - The elusive transporters with a high affinity for glutamate. **Tins**, **16**: 365-71, 1993.
- KASNER, D. - Vitrectomy: a new approach to the management of vitreous (Interview). **Highlights Ophthalmol.**, **11**: 304-, 1969.
- KASNER, D.; MILLER, G. R.; TAYLOR, W. H. ;SEVER, R. J.; NORTON, W. - Surgical treatment of amyloidosis of the vitreous. **Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.**, **72**: 410-8, 1968.
- KOZART, D. M. - Anatomic correlates of the retina. JAEGER, E. A & BENSON, W. E **Diseases of the Retina:vol. 3**, Chap. 1;1-18, 1979.

- KVAMME, E.; SCHOUSBOE, A.; HERTZ, L.; TORGNER, I. A.; SVENNEBY, G. – Developmental change of endogenous glutamate and gamma-glutamyl transferase in cultured cerebral cortical interneurons and cerebellar granule cells, in mouse cerebral cortex and cerebellum in vivo. **Neurochem. Res.**, **10**: 993-1008, 1985.
- JOHNSON, J. L. ; - The excitant amino acids glutamic and aspartic acids as transmitter candidates in the vertebrate central nervous system. **Prog. Neurobiol.**, **10**: 155-202, 1978.
- LAGRANGE; - Moyens chirurgicaux pour combattre l'hypotonie oculaire. **Ver. Gen d'Ophtalmol.**, **32**:379, 1912. In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 255.
- LARSON, S. - Electro-diathermy in detachment of the retina. **Arch. Ophthalmol.**, **7**:661, 1932. In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 260.
- LEBER, T. - Ueber die Entstehung der Netzhautablosung. **Ber. Dtsch. Ophthalmol. Ges.** **14**:18, 1882. In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 246.
- LE MER, Y. - Use of liquid perfluorocarbons in vitrectomy for difficult cases of proliferative diabetic retinopathy. **J. Fr. Ophthalmol.**, **18**: 366-72, 1995.

- LEE, K. J., PEYMAN, G. A.; PARIS, C. L.; ALTURKI, W. A.; DESAI, U. R. - Management of retinal detachment associated with choroidal coloboma using perfluoroperhydrophenanthrene. **Ophthalmic Surg**, **23**: 553-4, 1992.
- LINCOFF, H. A.; BARAS, I.; McLEAN, J. - Modifications to the Custodis procedures for retinal detachment. **Arch. Ophthalmol.**, **73**:160, 1965.
- LINCOFF, H. A. - Modification of the Custodis procedure. A new silicone implant for large tears. **Am. J. Ophthalmol.**, **64**:877-9, 1967.
- LINCOFF, H. A.; KREISSING, I.; HAHN, Y. S. - A temporary balloon buckle for the treatment of small retinal detachments. **Ophthalmology.**, **86**: 586-96, 1979.
- LINCOFF, A.; HAFT, D.; LIGGETT, P.; REIFER, C. - Intravitreal expansion of perfluorocarbon bubbles. **Arch. Ophthalmol.** **98**: 1646, 1980.
- LINCOFF, H. A.; MAARDIROSSIAN, J.; LINCOFF, A., LIGGETT, P., IWAMOTO, T.; JAKOBIEC, F.; - Intravitreal longevity of three perfluorocarbon gases. **Arch. Ophthalmol.**, **98**: 1610-1, 1980.
- LINCOFF, H. A.; MAISEL, J. M.; LINCOFF, A. - Intravitreal disappearance rates of four perfluorocarbon gases. **Arch. Ophthalmol.**, **102**: 928-9, 1984.
- LINCOFF, H. A.; WEIMBERGER, D.; STERGIU, P. - Air travel with intraocular gas. II Clinical considerations. **Arch. Ophthalmol.**, **107**:907-10, 1989.
- LINDNER, K. - Ein Beitrag zur Entstehung und Behandlung der idiopathischen und der traumatischen Netzhautabhebung. **Arch. f. Ophthalmol.**, **127**: 177, 1931.

- LINDROTH,P & MOPPER, K – High performance liquid chromatography of subpicomole amounts of amino acids by pre colum fluorescence pre derivation with O-phtaldehyde. **Anal. Chem.**; **51**: 1667-777, 1979.
- LIU. KR; PEYMAN, GA; CHEN, MS; CHANG, KB – Use of high-density vitreous substitutes in the removal of posterioly dislocated lenses or intraocular lenses. **Ophthalmic Surg.**, **22**: 503-7, 1991.
- LUCAS, F.; NEWHOUSE.J. B. - The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. **Arch. Ophthalmol.**, **58**: 193-204, 1957.
- MACHEMER, R.; AABERG, T. M.; NORTON, E. W. D. -Giant retinal tears: II. Experimental production and management with intravitreal air. **Am. J. Ophthalmol.**, **68**: 1022-9, 1969.
- MACHEMER,R.; BUETTNER,H.; NORTON,E. W. D.; PAREL,J. M. - Vitrectomy: a pars plana approach. **Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.**, **75**: 813-20, 1971.
- MACHMER, R. & ALLEN, A. W. - Retinal tears 180 degrees and greater: Management with vitrectomy and intravitreal gas. **Arch. Ophthalmol.**, **94**: 1340-6, 1976.
- MCALLISTER, I. L.; ZEGARRA, H.; MEYERS, S. M., GUTMAN. F. A. - Treatment of retinal detachment with multiple breaks by pneumatic retinopexy. **Arch. Ophthalmol.**, **105**: 913-6, 1987.
- MATHIS, A.; PAGOT,V.; DAVID, J. L- The use of perfluorodecalin in diabetic vitrectomy. **J Vitreo Retina**, **1**: 28-9, 1992.
- MICHELS, R. M.; WILKINSON,C. P.; RICE,T- Retinal detachment. St. Louis. .C. V. Mosby Company., p. 379-458, Toronto,1990.

- MICHELS, R. M.; WILKINSON, C. P.; RICE, T. - Retinal detachment. St. Louis, C. V. Company; p. 625-760; Toronto, 1990.
- MILLER, R. F. - Are single neurons both excitatory and inhibitory?. **Nature**, **336**: 517-8, 1988.
- MILLER, R. F.; SLAUGHTER, M. M. - Excitatory amino acid receptors of the retina: diversity of subtypes and conductance mechanisms. **Tins**, **9**: 211-9, 1986.
- MILLSAP, C. M.; PEYMAM, G. A.; MA, P. E.; GREVE, M. D. J. - The surgical management of retinopathy of prematurity using a perfluorocarbon liquid. **Int Ophthalmol.**, **18**: 97-100, 1994.
- MIYAMOTO, K.; REFOJO, M. F.; TOLENTINO, F. I.; FOURNIER, G. A.; ALBERT, D. M. - Fluorinated oils as experimental vitreous substitutes. **Arch. Ophthalmol.**, **104**: 1053-6, 1986.
- MIYAMOTO, K.; REFOJO, M. S.; TOLENTINO, F. I.; FOURNIER, G. A.; ALBERT, D. M. - Perfluoroether liquid as a long-term vitreous substitute. An experimental study. **Retina**, **4**: 264-8, 1984.
- MOREIRA, H.; DE QUEIROZ, JUNIOR J. M.; LIGGETT, P. E.; McDONELL P. J. - Corneal toxicity study of two perfluorocarbon liquids in rabbit eyes. **Cornea**, **11**: 376-9, 1992.
- MOREIRA JUNIOR, C. A.; USCOCOVICH, C. E.; MOREIRA, T. - Experimental studies with perfluoro-octane for hemostasis during vitreoretinal surgery. **Retina**, **17**: 530-4, 1997.
- MOTTA, M. M. S. - Avaliação da retinopexia pneumática com hexafluoreto de enxofre em descolamentos de retina regmatogênicos. **Rev. Bras. Oftalmol.**, **48**: 69-78, 1989.

- MÜLLER, L. - Eine neue operative Behandlung der Netzhautabhebung. **Klin. Monatsbl. Augenheilkd.**, **41**: 459, 1903. In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 255.
- NABIH, M.; PEYMAN, G. A.; CLARK, L. C. JR; HOFFMAN, R. E. ;MICELI, M.; ABOU-STEIT, M. TAWAKOL, M.; LIU, K. R. - Experimental evaluation of perfluorophenathrene as a high specific gravity vitreous substitute: A preliminary report. **Ophthalmic Surg.**, **20**; 286-93, 1989.
- NEHEMY, M. B. - Gases em cirurgia vitreoretínica. **Arq. Bras. Oftalmol.**, **59**: 96-9, 1996.
- NORTON, E. W. D. - Intraocular gas in the management of selected retinal detachments. **Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.**, **77**: OP85-98, 1973.
- NOVAK, J. Z. - Isolated retina as a model of the CNS in pharmacology. **Tips**, **9**: 80-2, 1988.
- OHM, J. - In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 584.
- OLNEY, J. W. - Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electronmicroscopy of the evolving lesion. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **28**: 445-74, 1979.
- OLNEY, J. W. - Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus: An electronmicroscopy study. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**; **30**: 75-90, 1971.

- OLNEY, J. W. - Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: Mc GEER, E. G.; OLNEY, J. W. and McGEER, P. L., (eds), *Kainic is a tool in neurobiology*. New York, Raven Press, pp. 95- 121, 1978.
- PARVER, L. -Intraocular gas tamponades used in retinal surgery. **Ann. Ophthalmol.**, **11**: 109-11, 1979.
- PENN, R. D. & HAGINS, W. . A. - Signal transmission along retinal rods and the origin of the electroretinographic a-wave. **Nature**, **223**: 201-4, 1969.
- PERRY, T. L. – Cerebral amino acids pools. In: LAJTHA .A. (2. ed) *Handbook of neurochemistry. Chemical and celular architerture*. New York, Plenum, V. 1, 151-80, 1982.
- PEYMAN, G. A.; BLINDER, K. J.; PARIS, C. L. et al - Vitreon: A new perfluorocarbon vitreous substitute. **Afro-Asian J Ophthalmol.**, **10**: 48-57, 1991.
- PEYMAN, G. A.; SCHULMAN, J. A.; SULLIVAN, B. - Perfluorocarbon Liquids in ophthalmology. **Surv. Ophthalmol.**, **39**: 375-95, 1995.
- PEYMAN, G. A. & SCHULMAN, J. A. - *Intravitreal Surgery: Principles and Practice*. Norwalk, CT, Appleton-Century-Crofts, p. 384, 1986.
- PILLAT, A. – Ergebnisse mit der Luftinjektion in den Glaskoper nach diathermischer Operation gegen Nethautablosung. **Verh. Osterr. Ophthalmol. Ges.**, **53**:57,1957. In: Tornambe. P. E.: *Pneumatic retinopexy Survey Ophthalmology* 32:270-81, 1988
- RETINA SOCIETY TERMINOLOGY COMMITTEE - The clasification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. **Ophthalmology**, **90**: 121-5, 1983.

- REYNOLDS, M. G.; HAIMOVICI, R.; FLYNN, H. W. Jr.; DiBERNARDO, C.; BYRNE, S. F.; FEUER, W. - Supra-choroidal hemorrhage: Clinical features and results of secondary surgical management. **Ophthalmology**, **100**: 460-5, 1993.
- ROIZENBLATT, J. & COSTA, V. P. - Retinopexia pneumática: quando e onde. **Arq. Bras. Oftalmol.**, **55**: 56-62, 1992.
- ROSENGREN, B. - Results of treatment of detachment of the retina with diathermy and injection of air into the vitreous. **Acta Ophthalmol.**, **16**: 573-9, 1938.
- ROSENGREN, B. - 300 cases operated upon for retinal detachment: methods and results. **Acta Ophthalmol.**, **30**: 117-122, 1952.
- ROTHMAN, S. M. & OLNEY, J. W. - Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. **Ann. Neurol.**, **19**: 105-11, 1986.
- ROTHMAN, S. M. & OLNEY, J. W. - Excitatory and the NMDA receptor. **Trends. Neurosci.**, **10**: 299-302, 1987.
- ROTTER, H. - Technique of biomicroscopy of the posterior eye. **Am. J. Ophthalmol.**, **42**: 409, 1956.
- RUETE, C. G. T. - Der Augenspiegel und das Optometer für praktische Uerzte. Verlag der Dieterichschen Buchhandlung, Göttingen, 1852. In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P.; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 248.
- RUDE, R. E.; BUSH, L. R.; TILTON, G. D. - Effects of fluorocarbons with and without oxygen supplementation on cardiac hemodynamics and energetics. **Am. J. Cardiol.**, **54**: 880-3, 1984.

- SABATES, W. I.; ABRAMS, G. W.; SWANSON, D. E.; NORTON, E. W. D. -
The use of intraocular solutions in the pathogenesis of the postvitrectomy
retinal edema. **Esp. Curr. Eye Res.**, **6**: 1369-79, 1987.
- SAFAR, K. - Behandlung der Netzhautabhebung mit Elektroden für multiple
diathermische Stichelung. **Ber. Dtsch. Ophthalmol. Ges.** **49**:119, 1932.
In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P.; Rice, T. A. -Retinal Detachment The
C. V. Mosby Company. Toronto. 1990. p. 260.
- SARGENT, J. W. & SEFFL, R. J. -Properties of perfluorinated liquids. **Fed
Proc.**, **29**: 1699-1703, 1970.
- SCHEPENS, C. L. - A new ophthalmoscope demonstration. **Trans. Am. Acad.
Ophthalmol. Otolaryngol.**, **51**:298, 1947.
- SCHEPENS, C. L.; OKAMURA, I. D.; BROCKHURST, R. J. - The scleral
buckling procedures. I- Surgical techniques and management. **Arch.
Ophthalmol.**, **58**:797, 1957.
- SCHEPENS, C. L.; FREEMAN, H. M.; THOMPSON, R. F. - A power-driven
multipositional operating table. **Arch. Ophthalmol.**, **73**: 671, 1965.
- SKOLIK, S. A.; MOREIRA, C. A.; FREEMAN, V. R.; et al: Liquid
perfluorocarbons for control of bleeding during pars plana vitrectomy: An
animal model and human clinical correlation. **Invest. Ophthalmol. Vis.
Sci.**, **32 (Suppl)**: 881, 1991.
- SPARROW, J. R.; ORTIZ, R.; MacLEISH, P. R.; CHANG, S. - Fibroblast
behavior at aqueous interfaces with perfluorocarbon, silicone and
fluorosilicone liquids. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **31**: 638-46, 1990.
- SUNNESS, J. S.; SCHUCHARD, R. A.; SHEN, N.; RUBIN, G. S.;
DAGNELIE, G.; HASEWOOD, D. M. - Landmark- driven fundus

- perimetry using the scanning laser ophthalmoscope. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **35**:1863-74, 1995.
- SUZUKI, H. - Vitrectomia a céu aberto. Instrumentação. **Rev. Bras. Oftal.**, **35**: 179, 1976.
- SUZUKI, H. - Tesoura intra-vítrea para seção de bandas organizadas no vítreo. **Rev. Bras. Oftal.** - **36**: 625-7, 1977.
- SUZUKI, H. - **Vitrectomia via pars plana**: contribuição ao tratamento da hemorragia vítrea de origem não diabética. (Tese Livre Docência-Faculdade de Medicina-Universidade de São Paulo), 1982.
- SUZUKI, H. - Encarceramento programado da retina no tratamento cirúrgico da rotura gigante com o retalho posterior evertido. **Arq. Bras. Oftal.**, **52**: 102, 1989.
- SUZUKI, H. & NAKASHIMA, Y. - Vitrectomia via pars plana: sistema simplificado para infusão intraocular. **Rev. Bras. Oftalmol.**, **41**: 383-5, 1982.
- SUZUKI, H.; NAKASHIMA, Y.; HELAL, J. - Vitrectomia via pars plana: sistema automatizado de aspiração e focalização. **Rev. Bras. Oftalmol.**, **41**: 63-6, 1982.
- TIMBERLIKE, G. T.; MAINSTER, M. A; WEBB, R. H.; HUGHES, G. W., TREMPLE, C. L. - Retinal localization of scotomata by scanning laser ophthalmoscopy. **Invest. Ophthalmol. Vi. Sci.**, **22**: 91-7, 1982.
- TORNAMBE, P. E. - Pneumatic retinopexy. **Surv. Ophthalmol.** - **32**: 270-81, 1988.

TRANTAS, A. - Moyens d'explorer par l'ophthalmoscope et par translucidite la part anterieure du fond oculaire, le cercle ciliaire y compris. **Arch. d'Ophthalmol.**, 20:214, 1900.

UNO, F.; BONOMO, P.P.; FARAH, M.E. - Retinopexia pneumática: estudo colaborativo de 51 casos. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Oftalmologia. Porto Alegre, RS, 1993.

VAIL, T. D. - An inquiry into results of the established treatment of detachment of the retina and a new theory. Trans. **Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.**, 17:29, 1912. In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 256.

VOGT, A. - Operative treatment of detachment of the retina. **Arch. Ophthalmol.**, 10:293, 1933.

VON GRAEFE, A- Perforetion von abgelosten Netzhauten und Glaskorpermembranen. **Arch. f. Ophthalmol.**, 9:84, 1863. In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto. 1990. p. 254.

WARDROP, J.: Essays on the morbid anatomy of human eye, ed. 2. Geoege Ramsey and Co. Edinburgh, 1820.

WARE, J. - Chirurgical observations relative to the eye, ed. 2, vol. 2. J. Mawman. P. 238, London, 1805. In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 245.

- WEVE, H. J. -Zur Behandlung der Netzhautablosung mittels Diathermie. **Abhandlungen aus der Augenheilkunde: No. 14**, 1932. In: Michels, R. G. Wilkinson, C. P; Rice, T. A. -Retinal Detachment The C. V. Mosby Company. Toronto, 1990. p. 260.
- WILSON, C. A.; BERKOWITZ, B. A.; SREBRO, R. - Perfluorinated vitreous substitute increases retinal tolerance to ischemia (abstract). **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci** **35.**, (suppl):2070, 1994.
- VYGANTAS, C. M.; PEYMAN, G. A; DAILY, M. J. ;ERICSON, E. S. - Octafluorocyclobutane and other gases for vitreous replacement. **Arch. Ophthalmol.**, **90**: 235-6, 1973.
- YAMANE, R.; VILAR, E. G.; FREITAS, J. A. H.; CÂMARA, A. G.; HERZOG NETO, G. - Estudo experimental do efeito do SF₆ sobre a retina por meio da microscopia óptica e eletrônica. **Rev. Bras. Oftalmol.** ,**51**:33-42, 1992.
- ZIMMERMAN, N. J. & FARIS, D. - The use of N-perfluorocarbon amines in complicated retinal detachments (abstract). **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **25** (suppl): 258, 1984.