

Avaliação histopatológica do polimetilmetacrilato em ratos ao longo de um ano

Histopathological evaluation of polymethylmethacrylate in rats for one year

DÉCIO LUÍS PORTELLA DE
CAMPOS¹

RICARDO SESTITO PROTO²

DANIEL CARMONA DOS
SANTOS³

ROGERIO DE OLIVEIRA RUIZ⁴

NELSON BRANCACCIO⁵

HAMILTON ALEARDO

GONELLA⁶

Trabalho realizado na Faculdade de
Medicina de Sorocaba - Pontifícia
Universidade Católica de São
Paulo, Sorocaba, SP, Brasil.

Trabalho recebeu prêmio Evaldo
D'Assumpção, 2010.

Artigo submetido pelo SGP
(Sistema de Gestão de Publicações)
da RBCP.

Artigo recebido: 9/1/2011

Artigo aceito: 10/6/2011

RESUMO

Introdução: O PMMA é utilizado como preenchedor permanente na forma de microesferas. Existem diversas apresentações comerciais, muitas são utilizadas indiscriminadamente. **Objetivo:** Avaliação histológica (do local aplicado e órgãos) após preenchimento com PMMA em ratos. **Método:** Utilizaram-se 60 ratos Wistar, todos receberam aplicação de 1 ml de PMMA (Meta-Crill®) em plano profundo, próximo à região occipital. A eutanásia ocorreu em grupos de 15 ratos no 1º, 3º, 6º e 12º mês após aplicação. **Resultados:** Identificada presença de infiltrado inflamatório e fibrose no local injetado, além da diminuição da quantidade de PMMA em todas as amostras. Reação de corpo estranho (RCE) tipo granuloma ocorreu em 3,3% das amostras (2 ratos). A análise estatística mostrou-se significante pelo teste de Kruskal-Wallis. **Conclusão:** O PMMA utilizado apresentou maior RCE e evidente fibrose em amostras tardias, podendo ocorrer RCE tipo granuloma. Embora o PMMA pareça seguro, diversas complicações podem ocorrer. Sua utilização deve ser criteriosa, sabendo que granulomas ocorrem independente da técnica.

Descritores: Polimetil metacrilato. Microesferas. Ratos. Histologia. Fibrose. Reação a Corpo Estranho.

ABSTRACT

Introduction: PMMA is used as a permanent filler in the form of microspheres. There are several commercial applications; many of them are used indiscriminately. **Objective:** Histological evaluation (of the applied place and organs) after PMMA filling in rats. **Methods:** 60 Wistar rats were used; each received an application of 1 ml of PMMA (Meta-Crill®) in deep frame (near the occipital region). The euthanasia occurred in groups of 15 rats at 1, 3, 6 and 12 months after application. **Results:** Presence of inflammatory infiltrate and fibrosis in the injected site, in addition to the reduced amount of PMMA in all samples. Foreign body reaction (FBR) granuloma type occurred in 3.3% of samples (2 mice). Statistical analysis was shown significant by Kruskal-Wallis. **Conclusion:** The PMMA used had a higher FBR and evident fibrosis in late samples, occurring FBR granuloma type. Although the PMMA seems safe, several complications can occur. Its use should be judicious, knowing that granulomas occur regardless of the technique.

Keywords: Polymethyl methacrylate, Microspheres. Rats. Histology. Fibrosis. Foreign-Body Reaction.

1. Membro Especialista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica (SBCP); Preceptor do Serviço de Cirurgia Plástica Linneu Mattos Silveira da Pontifícia Universidade Católica (PUC) - Sorocaba, Sorocaba, SP, Brasil.
2. Médico Residente de Cirurgia Plástica do Serviço de Cirurgia Plástica Linneu Mattos Silveira da PUC - Sorocaba, Sorocaba, SP, Brasil.
3. Médico Residente do Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital Municipal Dr. Mario Gatti, Sorocaba, SP, Brasil.
4. Membro Titular da SBCP, Médico Preceptor do Serviço de Cirurgia Plástica Linneu Mattos Silveira da PUC - Sorocaba, Sorocaba, SP, Brasil.
5. Doutor; Professor da Disciplina de Patologia da PUC - Sorocaba, Sorocaba, SP, Brasil.
6. Doutor; Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da PUC - Sorocaba e Regente do Serviço Linneu Mattos Silveira, Sorocaba, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

Recentemente, substâncias preenchedoras com fluidos de alta viscosidade ou partículas de polímeros em suspensão têm sido utilizadas em larga escala em procedimentos cosméticos e correção de lipodistrofia de pacientes HIV positivos¹.

A substância ideal deve ser segura, biocompatível, estável após implantação, não migratória, resistente a fagocitose, persistir e manter seu volume sem ser reabsorvida ou degradada; induzir mínima reação de corpo estranho; ser não teratogênica, não carcinogênica e não requerer testes alergênicos prévios ao seu uso^{2,3}.

O polimetilmetacrilato (PMMA) é um polímero utilizado como preenchedor na forma de microesferas sintéticas de 40 a 60 µm, veiculadas em meio de suspensão, que pode ser colágeno apteico ou cristalóide. Foi sintetizado em 1902 e tem sido usado como cimento ósseo no corpo humano. Sua excelente biocompatibilidade e não toxicidade vem sendo demonstradas em vários estudos desde 1930⁴. Conforme o veículo utilizado, existem diversas apresentações comerciais. Vários preceitos são necessários para a indicação e a aplicação adequada dessa substância; além disso as complicações granulomatosas podem ocorrer independente da técnica utilizada^{5,6}.

O uso de preenchimentos permanentes implica na responsabilidade médica de injeções precisas. O planejamento cuidadoso das profundidades de injeção e áreas de melhor eficácia é imperativo, assim como o domínio de eventuais complicações que podem ocorrer^{3,5}.

Infelizmente, o PMMA está sendo utilizado de modo indiscriminado em função de seu baixo custo. Sua venda não é restrita, de modo que profissionais não médicos ou mesmo médicos sem especialização adequada fazem aplicações da substância^{5,6}.

O objetivo deste estudo é avaliar histologicamente os efeitos locais da injeção de PMMA em ratos, bem como verificar a presença, durante o período de um ano, do material no local injetado e possíveis alterações histológicas em órgãos à distância.

MÉTODO

Este trabalho seguiu as normas para uso de animais de laboratório em experimentação, sendo conduzido de forma isenta de conflitos.

Utilizaram-se 60 ratos Wistar, idades entre 60 e 440 dias, pesos entre 240g e 350g. Os procedimentos foram realizados sob anestesia intramuscular, na coxa direita, com quetamina e xilazina. Após antisepsia com clorexidina alcoólica 0,5%, realizou-se o preenchimento em plano profundo do dorso, próximo à região occipital (Figura 1),

com 1 ml de polimetilmetacrilato (PMMA) - Meta-Crill® (gel a 30%)⁷. Os animais foram acompanhados e não apresentaram sinais flogísticos ou infecciosos no local da aplicação.

A eutanásia foi realizada em grupos de 15 ratos no 1º mês (grupo 1), 3º mês (grupo 2), 6º mês (grupo 3) e 12º mês (grupo 4) após aplicação. Ressecou-se o segmento de pele/subcutâneo até o plano muscular do local da aplicação e outros órgãos (cérebro, fígado, baço, rins, pulmões e coração) (Figura 2).

Os materiais ressecados foram mantidos em formol e enviados para estudo anatomopatológico, cortados com 5 µm de espessura e montados em lâminas. A análise foi realizada através da microscopia de luz, com microscópio Nikon® Eclipse 200. Todas as lâminas foram avaliadas por um mesmo patologista, que recebeu as amostras apenas numeradas.

Avaliou-se a quantidade de células inflamatórias, neoformação vascular, fibrose e PMMA nos fragmentos, com pontuação de 0 (nenhuma representação), 1 (até 25% do aspecto avaliado), 2 (25 a 50%), 3 (50 a 75%) e 4 (> 75%). Para avaliar a reação de corpo estranho (RCE) gerada pelo PMMA, utilizou-se a classificação para RCE de Durante et al.⁸ (Quadro 1).

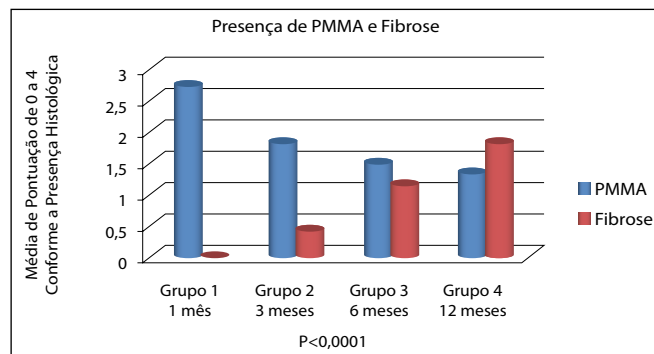


Figura 1 – Presença de PMMA e fibrose.

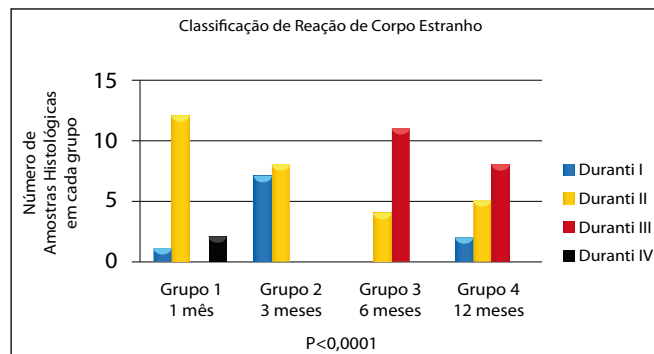


Figura 2 – Classificação da reação de corpo estranho nos diferentes grupos.

Quadro 1 – Classificação de Duranti.

Grau	Classificação de Duranti
I	Leve reação, com poucas células inflamatórias
II	Evidente reação inflamatória, com uma ou duas células gigantes
III	Tecido fibroso, com células inflamatórias, linfócitos e células gigantes
IV	Granuloma, com implante encapsulado e evidente reação de corpo estranho

As pontuações de PMMA e fibrose observadas nos quatro grupos foram comparadas utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os dados de classificação de Duranti foram analisados por meio de uma tabela de contingência para verificar a associação entre os grupos e a classificação. A associação foi obtida através do teste exato de Fisher. Em todos os testes foi utilizado o nível de significância de 5%. Todas as análises foram feitas utilizando-se os programas GraphPad v.4.0 e SAS for Windows v.9.2.

RESULTADOS

Observou-se a presença de infiltrado inflamatório no local de implantação do PMMA nas amostras histológicas com 1 e 3 meses (grupos 1 e 2, respectivamente), porém estes achados não se mantiveram constantes e diferiram das amostras com 6 e 12 meses (grupos 3 e 4). Nenhum dos órgãos distantes avaliados apresentou alterações histológicas.

A quantidade de PMMA no local injetado apresentou-se em menor quantidade nas amostras com 6 e 12 meses (grupos 3 e 4) comparado às amostras iniciais (grupos 1 e 2), resultado estatisticamente significativo pelo teste de Kruskal-Wallis. Na amostra com 1 mês (grupo 1), a presença de PMMA foi relativamente maior que nas demais amostras, mantendo-se homogênea nos demais grupos (avaliado pelo teste de Dunn). Dessa forma, fica evidente a diminuição do PMMA no local injetado conforme o tempo de evolução, sendo maior apenas com 1 mês após a aplicação (Tabela 1 e Figura 1).

Analisando-se da mesma forma a fibrose, existe significância entre o grupo 1 (1 mês) com grupo 3 e 4 (6 e 12 meses) e grupo 2 (3 meses) com grupo 3 e 4 (6 e 12 meses). Assim sendo, a presença de fibrose aparece aumentada nas amostras mais tardias (6 e 12 meses), sendo que no grupo 1 foi nula (Figura 1 e Tabela 2), condizendo com apenas a presença de infiltrado inflamatório local. As demais comparações foram não significativas.

A classificação de Duranti foi associada aos grupos (Tabela 3 e Figura 2); sendo estatisticamente significativa e evidenciando que a RCE grau II e III apresenta-se maior nas amostras com 6 e 12 meses (grupos 3 e 4). Sendo assim, fica claro o aumento da reação inflamatória e fibrose com o passar do tempo. Entre as amostras do grupo 1, dois ratos apresentaram a formação de granuloma evidente com material encapsulado (Duranti IV).

As Figuras 3 a 8 ilustram alguns aspectos histopatológicos dessa casuística.

Tabela 1 – Estatísticas descritivas para o PMMA e os quatro grupos.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	KW	p-valor
Média	2,73 ^a	1,80 ^b	1,47 ^b	1,33 ^b	28,12	<0,0001
Desvio padrão	0,59	0,41	0,52	0,82		
Mediana	3,00 ^a	2,00 ^b	1,00 ^b	2,00 ^b		

Medidas descritivas para PMMA e comparação entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis (KW). Médias e medianas seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Dunn. De acordo com a Tabela 1, existe significância entre os 4 grupos. Pelo teste de Dunn, o grupo 1 difere dos demais, não sendo observada diferença significativa entre os grupos 2, 3 e 4.

**Figura 3** – Preenchimento em plano profundo próximo à região occipital, com 1 ml de PMMA.**Tabela 2** – Estatísticas descritivas para fibrose e os quatro grupos.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	KW	p-valor
Média	0,00 ^a	0,40 ^{ab}	1,13 ^{bc}	1,80 ^c	30,93	<0,0001
Desvio padrão	0,00	0,51	0,83	0,94		
Mediana	0,00 ^a	0,00 ^{ab}	1,00 ^{bc}	2,00 ^c		

Medidas descritivas para fibrose e comparação entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis (KW). Médias e medianas seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Dunn.

Tabela 3 – Classificação de Duranti nas diferentes amostras para os quatro grupos.

Classificação Duranti	1 mês	3 meses	6 meses	12 meses	Total
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	
I	1	7	0	2	10
II	12	8	4	5	29
III	0	0	11	8	19
IV	2	0	0	0	2
Total	15	15	15	15	60
	p-valor<0,0001*				

Associação da classificação de Duranti com os quatro grupos. * Teste exato de Fisher. De acordo com a Tabela 3, nota-se que o aumento na classificação implica nos grupos mais tardios (3 e 4).



Figura 4 – Pele e subcutâneo até o plano muscular (no canto inferior esquerdo) e demais órgãos.

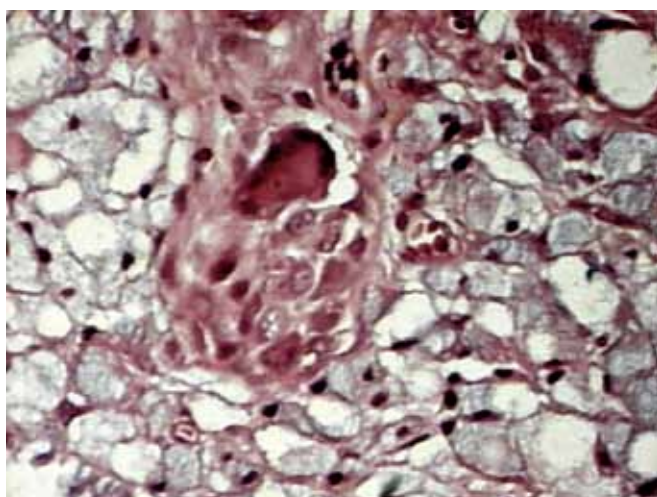


Figura 5 – Aumento de 200x presença de células gigantes.

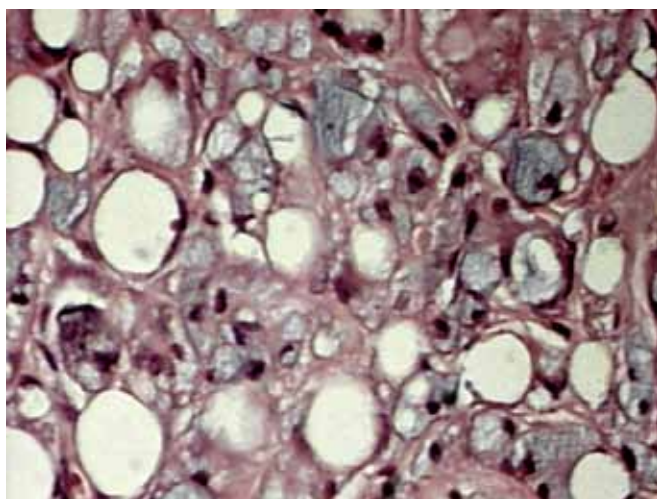


Figura 6 – Aumento de 100x - presença evidente de infiltrado inflamatório.

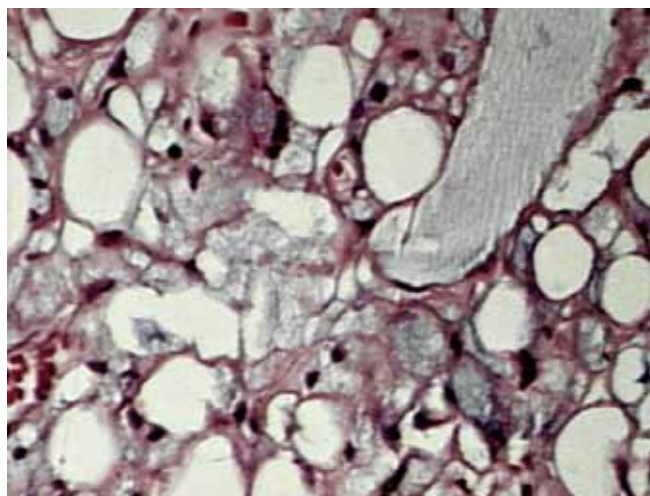


Figura 7 – Aumento de 100x - PMMA em coloração cinza (maior no canto superior direito) e infiltrado inflamatório crônico.

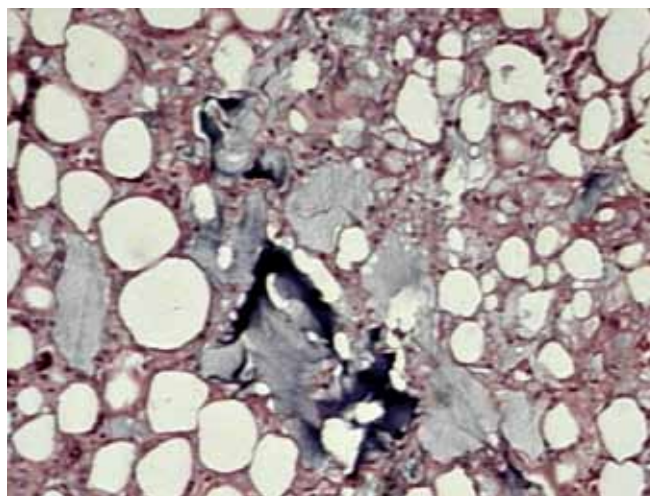


Figura 8 – Aumento de 100x - PMMA (ao centro/em cinza) com calcificações e fibrose.

DISCUSSÃO

Reações ao PMMA são divididas em: de curto, intermediário e longo prazo. O evento final da RCE é a fibrose e, quanto mais irritante o agente, mais pronunciada ela é^{4,6,9}.

O PMMA aparenta ser mais estável que outras substâncias. Quando injetado, não é lisado por enzimas porque o grupo metil o estabiliza e quando aplicado em planos superficiais, torna-se desastroso^{2,4,10}. Inicialmente, os artigos sugeriam uma evolução favorável, enquanto publicações posteriores descreveram complicações⁶ que, mesmo sendo raras, podem apresentar-se graves.

Quanto à histologia, ocorre a chegada de macrófagos resultando em cascata de citocinas^{5,11,12}. A biocompatibilidade varia conforme o tamanho, forma e superfície: partículas irregulares ocasionam maior resposta inflamatória; vários tamanhos induzem intensa RCE^{3,5,11-14}.

Considerando-se os diferentes fabricantes, a formação de granulomas varia entre 2,5 e 0,01% das aplicações⁶. Clinicamente, todos os fluidos injetáveis podem causar RCE e, até que a imunologia seja compreendida, é impossível prever seu desenvolvimento tardio^{1,3,9,12,14}. Em nossas amostras, tivemos dois (3,3%) ratos com RCE evidente e encapsulamento do PMMA, demonstrando que esta complicação pode ocorrer em casos recentes (1 mês).

Avaliações da pele humana^{3,14} demonstraram o encapsulamento da microesfera com camada de colágeno, macrófagos e fibroblastos após um mês. Entre o 3º e o 6º mês, há presença de macrófagos e células gigantes. No 9º mês, o PMMA apresenta tamanho intacto, sugerindo a não fagocitose ou migração das microesferas: contradizendo este estudo que encontrou menor quantidade de PMMA a partir do 3º mês, porém em ratos.

Embora o PMMA aparente ser seguro, ele exibe complicações diversas em função da imunologia do hospedeiro reagir de diferentes formas⁹. Alguns estudos sugerem⁴ que infecção crônica seja a causa do desenvolvimento de nódulos inflamatórios. Microorganismos são encontrados em camadas profundas da pele, além da flora normal, pela contaminação de procedimentos.

Neste estudo, a não utilização de microscopia eletrônica impediu a avaliação de possíveis micropartículas de PMMA em órgãos distantes. Segundo Lemperle et al.², partículas de 4,3 µm e de 20 µm foram encontradas nos pulmões de rato após 6 meses. Mas, acima de 40 µm não houve disseminação para órgãos distantes.

Portanto, o uso de PMMA implica na responsabilidade médica, indicação precisa e aplicação adequada, sabendo-se que complicações granulomatosas ocorrem independente da técnica^{3,5,6,10}.

CONCLUSÃO

O presente estudo apresentou maior reação de corpo estranho e evidente fibrose em amostras tardias com 6 e 12 meses após sua aplicação. Também, verificou-se a presença diminuída de PMMA em todas as amostras avaliadas (diminuição sequencial do 1º ao 12º mês). Não se observou a presença de PMMA nos órgãos à distância.

REFERÊNCIAS

- Lemperle G, Morhenn V, Charrier U. Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation. *Aesthetic Plast Surg.* 2003;27(5):354-66.
- Lemperle G, Morhenn VB, Pestonjamas V, Gallo RL. Migration studies and histology of injectable microspheres of different sizes in mice. *Plast Reconstr Surg.* 2004;113(5):1380-90.
- Graivier M, Cohen SR. The semipermanent and permanent dermal/subdermal fillers supplement. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118(Suppl):6S.
- Christensen L, Breiting V, Janssen M, Vuust J, Hogdall E. Adverse reactions to injectable soft tissue permanent fillers. *Aesthetic Plast Surg.* 2005;29(1):34-48.
- Vargas AF, Amorim NG, Pintanguy I. Complicações tardias dos preenchimentos permanentes. *Rev Bras Cir Plást.* 2009;24(1):71-81.
- Salles AG, Lotierzo PH, Gemperli R, Besteiro JM, Ishida LC, Gimenez RP, et al. Complications after polymethylmethacrylate injections: report of 32 cases. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121(5):1811-20.
- Nutricel Laboratórios. Disponível em: <http://www.metacrill.com.br>
- Duranti F, Salti G, Bovani B, Calandra M, Rosati ML. Injectable hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation. A clinical and histological study. *Dermatol Surg.* 1998;24(12):1317-25.
- Lemperle G, Rullan PP, Gauthier-Hazan N. Avoiding and treating dermal filler complications. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118(3 Suppl):92S-107S.
- Requena C, Izquierdo MJ, Navarro M, Martínez A, Vilata JJ, Botella R, et al. Adverse reactions to injectable aesthetic microimplants. *Am J Dermatopathol.* 2001;23(3):197-202.
- Tomazic-Jezic VJ, Merritt K, Umbreit TH. Significance of the type and the size of biomaterial particles on phagocytosis and tissue distribution. *J Biomat Mater Res.* 2001;55(4):523-9.
- Morhenn VB, Lemperle G, Gallo RL. Phagocytosis of different particulate dermal filler substances by human macrophages and skin cells. *Dermatol Surg.* 2002;28(6):484-90.
- McClelland M, Egbert B, Hanko V, Berg RA, DeLustro F. Evaluation of artecoll polymethylmethacrylate implant for soft-tissue augmentation: biocompatibility and chemical characterization. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100(6):1466-74.
- Zimmermann US, Clerici TJ. The histological aspects of fillers complications. *Semin Cutan Med Surg.* 2004;23(4):241-50.

Correspondência para:

Décio Luís Portella de Campos
Rua Profa. Maria de Lourdes Cruz Swenson, 240, apto 32 – Campolim – Sorocaba, SP, Brasil – CEP 18047-204
E-mail: decioportella@yahoo.com.br