ANA PAULA FRANCO DO AMARAL HVENEGAARD

Avaliação morfológica e molecular do epitélio e cápsula anterior
da lente de cães com catarata, submetidos à facoemulsificação
com o uso do azul de tripano a 0,1%

São Paulo
2015

ANA PAULA FRANCO DO AMARAL HVENEGAARD

Avaliação morfológica e molecular do epitélio e cápsula anterior da lente de cães com catarata, submetidos à facoemulsificação com o uso do azul de tripano a 0,1%

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros

Co-orientador:

Profa. Dra. Nadia Campos de Oliveira Miguel

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3090
FMVZ

Hvenegaard, Ana Paula Franco do Amaral
Avaliação morfológica e molecular do epitélio e cápsula anterior da lente de cães
com catarata, submetidos à facoemulsificação com o uso do azul de tripano a 0,1% /
Ana Paula Franco do Amaral Hvenegaard. -- 2015.
108 f. :il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros.

Co-Orientador: Profa. Dra. Nadia Campos de Oliveira Miguel.

1. Lente. 2. Cães. 3. Diabetes. 4. Azul de tripano. 5. Catarata. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação morfológica e molecular do epitélio e cápsula anterior do cristalino de cães com catarata, submetidos à facoemulsificação com uso do azul de tripano 0,1%", protocolado sob o nº 2964/2013, utilizando 50 (cinquenta) cães, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research "Morphologic and molecular evaluation of the epithelium and anterior capsule of the canine lens, with cataracts, after surgery utilizing 0,1% trypan blue during capsulorhexis", protocol number 2964/2013, utilizing 50 (fifty) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 18 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: HVENEGAARD, Ana Paula Franco do Amaral

Título: **Avaliação morfológica e molecular do epitélio e cápsula anterior da lente de cães com catarata, submetidos à facoemulsificação com o uso do azul de tripano a 0,1%**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIAS

Com todo o meu amor, dedico esta tese á **minha família**.

Primeiramente e em especial à minha **Mãe**, que esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida e não teria sido diferente neste.

Depois ao meu **Pai, Fernanda, Ri e Carol**.

Também à minha sobrinha e afilhada **Júlia**,
que ainda não nasceu, mas já é muito amada por todos.

Ao **Sansão** e à **Maria**.

Amo vocês demais!

Ao Felipe Hernandes Ruiz

Por todo o carinho, amizade, amor, companheirismo,
incentivo e, principalmente, por toda a compreensão.

Meu primeiro, meu último, meu tudo!

Quando eu penso que não conseguiria te amar
mais, você me surpreende e me prova o contrário!

As always...

À sua família,
Ivani, Maurício, Lúcia, Nana, Rô e Natália.
Em especial, à minha sobrinha **Nina.**
Também ao **Fellipinho** e à **Aline.**
É muito bom participar da vida de vocês

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros**, por toda
confiança e por ter me acompanhado, por todos estes anos,
nesse caminho tão apaixonante da pesquisa científica;
À **Dra. Angélica de Mendonça Vaz Safatle**, por todos os ensinamentos na
Oftalmologia Veterinária, auxílio neste projeto
e principalmente por sua amizade.
Serei sempre grata por tudo e sua eterna fã.

À Prof^a. Dra. Nádia C. O. Miguel

Pela pronta aceitação na co-orientação,
desenvolvimento e dedicação a este projeto e principalmente
pela amizade e cuidados durante todo esse período.

Espero podermos fazer diversos novos estudos!

Foi muito bom trabalhar com você.

Ao tio **Xande**, tio **Márcio** e tia **Joyce**.

Foi muito bom poder contar com vocês
em todos os momentos que precisei ir ao Rio de Janeiro.

A cidade de vocês é realmente maravilhosa!

À **Deus**, acima de tudo, por permitir que finalizasse
mais uma etapa importante da minha vida.

E claro, à **Nossa Senhora de Fátima**, que me
avisou que não iria ser fácil!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, às alunas **Thayane Gomes Seixas**, **Rayssa Lima**, **Amanda Lameu**, **Ana Carolina Santana da Silva**, **Luana Vicente de Melo**, ao amigo **Bryan Hudson Hossy** e ao técnico **Jorge Luis da Silva**, pelo auxílio na realização deste estudo. Não sei o que seria deste projeto se não fossem vocês! Na verdade sei, não teria havido projeto! Obrigada por tudo!

Agradeço ao **Dr. Mário Pereira**, pela realização da estatística, auxílio no desenvolvimento e entendimento desta e pela amizade e pronta realização das análises. Também à **Elza Faquim**, pelo auxílio na confecção da tese de acordo com as normas estabelecidas. Vocês foram incríveis!

À técnica de laboratório **Marguitte** e ao pós-graduando **Lucas**, por todo o auxílio na captura das imagens deste projeto. Também à **Profª. Maria Lucia Zaidan Dagli**, por conceder o uso do laboratório pelo qual é responsável.

Agradeço aos colegas de pós-graduação: **Eduardo Perlmann**, **Flávio Roncatti** e **Ana Eyherabide**, pela amizade e convívio nesta estressante jornada. Agradeço principalmente à **Ana Carolina Góes** e à **Michelle Barbosa**, pelo auxílio na colheita das cápsulas e pela sincera amizade. Amo vocês!

À **Profª. Dra. Aline Bolzan**, pelos ensinamentos, amizade e principalmente paciência.

À querida amiga **Graziele Massae Shimamura** e com muito carinho à amiga/irmã/mentora **Milena Sefrin Helzel**, pelo convívio, amizade e companheirismo por todos esses anos.

Agradeço à **Profª. Dra. Andréia Barbosa** e a todos os professores do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro, instituição em que me formei, adquiri a base do meu conhecimento e tive o primeiro contato com a oftalmologia veterinária.

Ao amigo e secretário do Departamento de Cirurgia, **Belarmino Ney Pereira** e também à **Livia dos Santos Gimenes**, amiga e secretária do departamento e do programa de pós-graduação. Muito obrigada pela amizade e por todo o auxílio na resolução das questões inerentes ao programa.

Aos amigos/funcionários do Hospital Veterinário – USP, **Jesus dos Anjos Vieira** e **Otávio Rodrigues dos Santos**, por todo o apoio, auxílio e carinho.

Aos demais funcionários, médicos veterinários e residentes do Hospital Veterinário que, de alguma forma, participaram desta jornada.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, que me acolheu como aluna da pós-graduação e deu condições para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela bolsa concedida.

À todos os cães que participaram deste projeto e a seus cuidadosos proprietários, todo o meu carinho e respeito.

A todas as minhas amigas (os), veterinárias (os) e pessoas que participaram, de alguma forma, desta etapa da minha vida. Principalmente à **Daniela Parola**, **Patrícia Bonifácio Flor** e **Letícia Duwal**, grandes amigas/irmãs. Amo muito vocês.

RESUMO

HVENEGAARD, A. P. F. A. **Avaliação morfológica e molecular do epitélio e cápsula anterior da lente de cães com catarata, submetidos à facoemulsificação com o uso do azul de tripano 0,1%.** [Morphologic and molecular evaluation of the epithelium and anterior capsule of the canine lens, with cataracts, after surgery utilizing 0.1% trypan blue during capsulorhexis]. 2015. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A remoção cirúrgica da catarata é uma intervenção cada vez mais praticada na medicina veterinária e, com ela, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de reduzir as possíveis complicações de seu pós-operatório, tal como a opacidade da cápsula posterior, alteração ocasionada principalmente pela diferenciação e migração das células do epitélio lenticular para a cápsula posterior da lente. O objetivo deste estudo foi analisar a morfologia da cápsula anterior e seu epitélio pela coloração de rotina com hematoxilina-eosina; a composição molecular da cápsula pelas técnicas histoquímicas de PAS (avaliação de proteoglicanos) e *picrosirius red* (avaliação de colágeno IV); além da expressão de morte celular nas células epiteliais pelas técnicas de imunofluorescência com Beclina – 1 (autofagia) e Caspase – 3 (apoptose), em cães idosos com catarata diabética e não diabética do tipo hipermadura, submetidos ao uso ou não de azul de tripano a 0,1 % durante a cirurgia de remoção da catarata por facoemulsificação. Para o estudo, foram estudadas as células epiteliais e cápsula anterior da lente de 27 cães, sendo 21 fêmeas e 6 machos, de 8 a 12 anos de idade (média = 9,6 anos), de diversas raças, que foram primeiramente divididos em 2 grupos: GC (catarata hipermadura) e GCD (catarata diabética) e, depois, subdivididos em outros 4 grupos: os que utilizaram o corante: GAND (catarata hipermadura com azul de tripano) e GAD (catarata diabética com azul de tripano); e os que não foram submetidos ao uso do corante: GND (catarata hipermadura sem azul de tripano) e GD (catarata diabética sem azul de tripano). Os resultados das análises realizadas observaram que ambas as amostras, tanto as provenientes das cataratas hipermaduras, quanto as diabéticas, sofrem alterações em igual intensidade apesar do diferente processo de formação, ou seja, observou-se que houve positividade na expressão de morte celular do

epitélio por apoptose e autofagia em igual intensidade e independente da utilização de azul de tripano a 0,1 % em todos os grupos; que a composição molecular da cápsula quanto à quantidade de proteoglicanos e colágeno IV também é semelhante e que, apesar da cápsula apresentar-se mais espessada do que o normal, ainda preserva sua relação anatômica com o epitélio. Conclui-se, portanto, que as lesões ocasionadas pela formação da catarata diabética e hipermadura no epitélio e em sua membrana basal (cápsula) são semelhantes apesar da diferente fisiopatologia de formação, mas que o epitélio e a cápsula ainda preservam sua relação anatômica e morfologia. Com os resultados, também se pode sugerir que cães que apresentem cataratas destes tipos, devam apresentar menor risco de ocorrência de opacidade na cápsula posterior no pós cirúrgico da catarata.

Palavras-chave: Lente. Cães. Diabetes. Azul de tripano. Catarata.

ABSTRACT

HVENEGAARD, A. P. F. A. **Morphologic and molecular evaluation of the epithelium and anterior capsule of the canine lens, with cataracts, after surgery utilizing 0.1% trypan blue during capsulorhexis.** [Avaliação morfológica e molecular do epitélio e cápsula anterior da lente de cães com catarata, submetidos à facoemulsificação com o uso do azul de tripano a 0,1 %]. 2015. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Nowadays, surgical removal of cataracts in dogs is being considered a common intervention. Along with that, many studies have been realized aiming to reduce its post operative complications, such as the posterior lens capsule opacity, which occurs due to epithelium cells differentiation and migration to the posterior pole. The objective of this study was to evaluate, by morphometry (hematoxylin-eosin), histochemistry (PAS and picosirius red) and immunofluorescence (Caspase – 3 and Beclin – 1) analysis: the morphological alterations of the lens anterior capsule and its epithelium; the molecular components of the extracellular matrix; and the expression of lens epithelium cellular death (by autophagy and apoptosis), in elderly diabetic and non diabetic dogs with cataracts, after phacoemulsification surgery utilizing or not 0,1 % trypan blue. Twenty seven dogs, including 21 female and 6 male dogs, with ages varying from 8 to 12 years old (mean = 9.6 yo), of different breeds were studied. Animals were first divided into 2 groups: GC (hypermaturing cataracts) and GCD (diabetic cataracts); then, subdivided in 4 different groups: GAND (non diabetic dogs with trypan blue), GAD (diabetic dogs with trypan blue), GND (non diabetic dogs without trypan blue) and finally, GD (diabetic dogs without trypan blue). Results showed that both types of studied samples (diabetic and hypermaturing ones), are equally altered besides its different pathophysiology, since no statistical significant differences were observed in both capsule and epithelium thickness, type IV collagen and proteoglycans concentration and also, in the epithelium cells autophagy and apoptosis, observed by Caspase – 3 and Beclin – 1 expression in every studied group. In addition, 0,1 % trypan blue was not capable to demonstrate its toxicity rate, as cells were already under the referred death processes. In conclusion, our findings suggests that, besides the differences in both, hypermaturing and diabetic cataracts,

pathophysiologies of formation, serious and similar alterations are observed with the same intensity in the anterior lens capsule and its epithelium in dogs, what must probably reduce posterior lens capsule opacity post phacoemulsification surgery.

Key words: Lens. Dogs. Diabetes. Trypan blue. Cataracts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Eletromicrografia da cápsula lenticular (lc) discretamente separada do epitélio anterior da lente (cm)34
- Figura 2 - Representação esquemática das interações de colágeno IV e laminina e, da ligação entre elas com nidogênio, perlecan e outras moléculas na cápsula lenticular.....35
- Figura 3 - a. Observação da opacidade total do cristalino em um cão não diabético, com catarata madura, após a instilação de colírio midriático. Observar também a intensa congestão conjuntival; b. Observação da sutura em “Y” (seta), na lente de um cão com catarata diabética50
- Figura 4 - Opacidade de cápsula posterior observada em olho esquerdo sob midríase medicamentosa, em um cão macho, 7 anos, sem raça definida, após 3 meses da FACO. Observar a possível visibilização do fundo de olho (tapetum – coloração amarelo-esverdeada e região não-tapetal – marrom-avermelhada), o que permite sugerir o não comprometimento da visão.....56
- Figura 5 - Representação gráfica da diferença entre o tempo de catarata apresentado pelos cães estudados nos grupos GC e GCD. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p= 0,0001$).....73
- Figura 6 - Fotomicrografias obtidas de duas amostras coradas em HE, em um cão SRD com 10 anos de idade, do grupo GC (A) e em um cão da raça Lhasa Apso de 9 anos do GCD (B). Observa-se a cápsula (estrela), o núcleo de uma célula epitelial (seta preta fina), a face lenticular (seta branca com borda preta) e humoral da cápsula (seta preta grossa)75
- Figura 7 - Fotomicrografia obtida de um cão normal, de 12 anos de idade, *post mortem*. Observa-se a monocamada de células epiteliais (seta preta fina), aderidas à cápsula (estrela)76
- Figura 8 - Fotomicrografias obtidas de quatro amostras diferentes coradas em HE do grupo GCD, em um Schnauzer, fêmea, com 8 anos de idade, 5 meses de catarata e 7 meses de diabetes (A); em um Beagle, fêmea, de 8 anos de idade, com 2 meses de catarata e 2 meses de diabetes (B); em um Poodle, fêmea, de 9 anos de idade, com 10 meses de catarata e 10 meses de diabetes (C); e em um Labrador, macho, de 8 anos de idade, com 8 meses de catarata e 8 meses de diabetes (D). Observa-se em (A), a monocamada de epitélio presente, mas descolada da cápsula (estrela); em (B), o epitélio presente, aderido à cápsula, mas

<p>duplicado (seta preta fina mostra a presença de 2 núcleos); em (C), o epitélio mesclado à cápsula anterior, que se apresenta degenerada (seta branca com borda preta); em (D), o epitélio metaplásico, espessado, com diversas camadas de células (seta preta grossa)</p>	77
<p>Figura 9 - Representação gráfica da análise da espessura mínima de epitélio entre os grupos GCD e GC.....</p>	78
<p>Figura 10 - Representação gráfica da análise da espessura mínima da cápsula entre os grupos GCD e GC.....</p>	79
<p>Figura 11 - Representação gráfica da análise da espessura relativa mínima de epitélio (Espessura mínima do epitélio / Espessura mínima da cápsula) entre os grupos GCD e GC.....</p>	80
<p>Figura 12 - Fotomicrografias das amostras submetidas à técnica de PAS em um cão da raça West Highland White Terrier de 10 anos do GC (A) e um cão da raça Maltes de 11 anos do GCD (B). Observa-se a cápsula (estrela) corada na cor magenta (PAS) evidenciando os proteoglicanos</p>	81
<p>Figura 13 - Representação gráfica da análise da densidade óptica da técnica de PAS corado entre os grupos GC e GCD.....</p>	82
<p>Figura 14 - Fotomicrografias obtidas das amostras submetidas ao PSR em um cão da raça Maltes de 11 anos do GC (B) e um cão da raça West Highland White Terrier de 10 anos do GCD (A). Observa-se a cápsula corada na cor vermelha (PSR) evidenciando o colágeno IV</p>	82
<p>Figura 15 - Representação gráfica da análise da densidade óptica da técnica de PSR corado entre os grupos GC e GCD.....</p>	83
<p>Figura 16 - Fotomicrografias obtidas das amostras dos quatro grupos estudados, marcadas com Caspase – 3. Observar a positividade da expressão de morte celular por apoptose nas células do epitélio lenticular marcadas em verde fluorescente (seta branca) em: (A) Maltês, fêmea de 10 anos do GND; (B) SRD, fêmea, de 12 anos, do GAND; (C); Border Collie, fêmea, de 11 anos, do GD e (D); SRD, fêmea, de 12 anos, do GAD. Observa-se também a cápsula das amostras (estrela branca).....</p>	84
<p>Figura 17 - Representação gráfica da mensuração de intensidade de Caspase-3 nos diferentes grupos.....</p>	85
<p>Figura 18 - Fotomicrografias obtidas das amostras dos quatro grupos estudados, marcadas com Beclina – 1. Observar a positividade da expressão de morte celular por autofagia no citoplasma das células do epitélio lenticular marcadas em verde fluorescente</p>	

(seta branca) em: (A) Poodle, fêmea, de 8 anos do GND; (B) Yorkshire, fêmea, de 10 anos, do GAND; (C); Teckel, fêmea, de 12 anos, do GD e (D) Beagle, fêmea, de 8 anos, do GAD. Observam-se também as cápsulas das amostras (estrela branca)87

Figura 19 - Representação gráfica da mensuração de intensidade de Beclina - 1 nos diferentes grupos88

Quadro 1 - Anticorpos utilizados para as diferentes análises de imunofluorescência69

APÊNDICE A: Dados não incluídos.....108

Figura A – Fotomicrografias de amostras colhidas de cães sem qualquer alteração ocular. Observar em: (A) coloração com HE; (B) PAS; (C) Picrosirius red; (D) Caspase – 3 e (E) Beclina – 1. Observar a integridade da monocamada de epitélio, e sua correta aderência à cápsula (setas pretas finas) em (A) e (B); a coloração em magenta e vermelho, respectivamente, para positividade de proteoglicanos e colágeno IV na cápsula anterior (estrela branca) em (B) e (C) e, por fim, a negatividade de marcação dos anticorpos (seta branca fina) em (C) e (D), observada pela visibilização do DAPI (em azul) marcando o núcleo, mas a ausência da coloração em verde dos anticorpos testados.....108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição dos animais segundo sexo, idade, tempo de catarata e de diabetes nos grupos GC e GCD.....	74
Tabela 2 -	Distribuição das amostras segundo as análises realizadas	75
Tabela 3 -	Distribuição dos valores de espessura mínima do epitélio (μm) entre os grupos GC e GCD	78
Tabela 4 -	Distribuição dos valores de espessura mínima da cápsula (μm) entre os grupos GC e GCD	79
Tabela 5 -	Distribuição dos valores de relação epitélio/cápsula ($\mu\text{m}/\mu\text{m}$) entre os grupos GC e GCD	80
Tabela 6 -	Distribuição dos valores de densidade óptica quanto a coloração de PAS entre os grupos GC e GCD	81
Tabela 7 -	Distribuição dos valores de densidade óptica quanto a coloração de PSR entre os grupos GC e GCD	83
Tabela 8 -	Distribuição dos valores mensurados de Caspase-3 marcada no epitélio lenticular das amostras, submetidas ou não ao azul de tripano a 0,1%, nos diferentes grupos.....	85
Tabela 9 -	Distribuição dos valores mensurados de Caspase-3 marcada no epitélio lenticular dos 2 grandes grupos (GND e GD)	86
Tabela 10 -	Distribuição dos valores mensurados de Beclina - 1 marcada no epitélio lenticular das amostras, submetidas ou não ao azul de tripano a 0,1%, nos diferentes grupos.....	88
Tabela 11 -	Distribuição dos valores mensurados de Beclina - 1 marcada no epitélio lenticular dos 2 grandes grupos (GND e GD)	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Aldose Redutase
AT	Azul de Tripano
CCC	Capsulorrex circular contínua
Co.	Corporation
D.O.	Densidade óptica
ERG	Eletrorretinograma
EUA	Estados Unidos da América
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FGH	Fator de crescimento de hepatócitos
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
HE	Hematoxilina-eosina
HOVET	Hospital Veterinário
h	Horas
HS	Heparansulfato
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
LIO	Lente intraocular
M	Molares
MC	Microscopia confocal
ME	Matriz extracelular
mg/ml	Miligramas por mililitros

mg/kg	Miligramas por quilograma
mg/kg/dia	Miligramas por quilograma por dia
MHZ	Megahertz
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimols
mmHg	Milímetros de mercúrio
MO	Microscopia óptica
μm	Micrômetro
μmol/L	Milimol por litro
N	Normal
NADPH	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato
nm	Nanômetros
OCP	Opacidade de cápsula posterior
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Solução tampão fosfato
PDGF	Fator de crescimento de derivados de plaquetas
PIO	Pressão intraocular
PSR	Picrosirius Red
SMA	actina do músculo liso
SRD	Sem raça definida
TGF-β2	Fator de transformação de crescimento beta 2

TUNEL	TdT dUTP-biotin Nick End Labeling
USP	Universidade de São Paulo
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
%	Por cento
®	Marca registrada
μ	Micron
$\mu\text{m}/\mu\text{m}$	micrometro por micrometro
°	Graus
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
2	REVISÃO DE LITERATURA	33
2.1	ANATOMIA E FISIOLOGIA DA LENTE DO CÃO	33
2.1.1	Cápsula lenticular	33
2.1.1.1	Composição da cápsula lenticular.....	35
2.1.1.1.1	<i>Glicosaminoglicanos</i>	35
2.1.1.1.1.1	Heparansulfato	36
2.1.1.1.2	<i>Proteoglicanos</i>	36
2.1.1.1.2.1	Perlecan	37
2.1.1.1.2.2	Nidogênio	37
2.1.1.1.2.3	Fibronectina	37
2.1.1.1.2.4	Laminina	38
2.1.1.1.3	<i>Fibras – Sistema Colágeno – Colágeno tipo IV</i>	38
2.1.1.2	Espessura da cápsula lenticular.....	39
2.1.1.3	Difusão através da cápsula lenticular.....	39
2.1.1.4	Propriedades biomecânicas da cápsula.....	41
2.1.1.4.1	<i>Fenômeno de acomodação</i>	41
2.1.2	Cápsula anterior	41
2.1.3	Epitélio lenticular	42
2.1.3.1	Processos de morte celular no epitélio lenticular	43
2.1.4	Células da lente e substância fundamental amorfa	44
2.1.4.1	Transparência	45
2.2	FISIOPATOLOGIA DA CATARATA	46
2.2.1	Fisiopatologia da catarata diabética	46

2.2.1.2	Os efeitos da diabete na cápsula lenticular.....	47
2.2.2	Velocidade da progressão.....	48
2.3	AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	48
2.3.1	Exame oftálmico.....	49
2.4	TRATAMENTO DA CATARATA	50
2.4.1	Pré-operatório	51
2.4.2	A cirurgia	52
2.4.2.1	FACO	52
2.4.2.1.1	<i>Capsulorrexe.....</i>	53
2.4.2.1.1.1	<i>Azul de tripano</i>	54
2.4.3	Complicações pós-operatórias.....	55
2.4.3.1	Opacificação da cápsula posterior	56
3	OBJETIVO GERAL.....	60
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
4	MATERIAL E MÉTODO.....	62
4.1	CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS	62
4.2	PRÉ-OPERATÓRIO.....	63
4.2.1	Exames.....	63
4.2.2	Medicações.....	64
4.2.3	Demais recomendações	65
4.3	FACECTOMIA EXTRACAPSULAR POR FACOEMULSIFICAÇÃO	65
4.3.1	Anestesia	65
4.3.2	Cirurgia	65
4.3.3	Pós-operatório.....	66
4.3.4	Amostras.....	67

4.3.5	Técnicas de análises	67
4.3.5.1	Coloração de rotina por HE.....	68
4.3.5.2	Análises histoquímicas.....	68
4.3.5.2.1	<i>PAS</i>	68
4.3.5.2.2	<i>Picrosirius Red</i>	68
4.3.5.3	Análises por imunofluorescências.....	69
4.3.6	Captura de imagens	70
4.3.7	Análises Estatísticas	70
5	RESULTADOS	73
5.1	AMOSTRAS	73
5.2	ANÁLISES DE ROTINA E HISTOQUÍMICAS	75
5.2.1	HE	75
5.2.1.1	Variedades de epitélio.....	76
5.2.1.2	Análises morfológicas das amostras coradas em HE	77
5.2.1.2.1	<i>Espessura mínima do epitélio</i>	78
5.2.1.2.2	<i>Espessura mínima da cápsula</i>	79
5.2.1.2.3	<i>Relação epitélio/cápsula – Espessura relativa mínima</i>	79
5.2.2	PAS	80
5.2.2.1	Quantificação da intensidade de PAS nos diferentes grupos	81
5.2.3	<i>Picrosirius Red</i>	82
5.2.3.1	Quantificação da intensidade de <i>picrosirius red</i> nos diferentes grupos	83
5.3	ANÁLISES POR IMUNOFLUORESCÊNCIAS	83
5.3.1	Caspase – 3	83
5.3.1.1	Quantificação da intensidade de marcação de Caspase-3 nos diferentes grupos	85
5.3.2	Beclina – 1	86

5.3.2.1	Quantificação da intensidade de marcação de Beclina - 1 nos diferentes grupos	88
6	DISCUSSÃO	91
7	CONCLUSÕES	98
	REFERÊNCIAS	100
	APÊNCICE A	108

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da oftalmologia na medicina veterinária, a remoção cirúrgica da catarata vem se tornando uma intervenção cada vez mais praticada.

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido realizados para aprimorar as diversas técnicas e reduzir as possíveis complicações no pós-operatório, tal como a opacidade da cápsula posterior, alteração frequentemente observada tanto em pacientes humanos, quanto em animais.

Estudos em coelhos e no homem concluíram que o azul de tripano, um corante frequentemente utilizado durante a cirurgia, pode induzir à toxicidade e morte das células do epitélio do cristalino, uma das principais responsáveis pela formação desta opacidade.

Estudos realizados em pessoas com cataratas, diabéticas e não diabéticas, demonstraram que a taxa de apoptose nas células do epitélio lenticular é maior nos pacientes doentes e que, a lâmina basal também se mostra alterada, o que, supostamente, diminuiria a ocorrência da opacidade capsular. Em cães, a catarata diabética ocorre de maneira súbita e tem comprometimento bilateral. O metabolismo de sua formação é agressivo e acontece basicamente nas mesmas células do epitélio lenticular. Sugere-se, portanto, que este tipo de catarata também provoque importantes alterações nas estruturas da lente destes animais e que, por conseqüência, diminua o risco da opacidade.

Além desta, sugere-se que outro tipo de catarata grave, tal como a hipermadura, esta por sua vez tardia e crônica, mas frequentemente observada em países em desenvolvimento como o Brasil (onde o custo da cirurgia é alto e observa-se importante falta de profissionais habilitados), possam também provocar alterações importantes às células epiteliais e na sua cápsula.

De acordo com o exposto acima, é importante conhecer a morfologia, os componentes da matriz extracelular da cápsula anterior e os processos de morte celular programada por autofagia e apoptose, nas células do epitélio da lente de cães idosos apresentando cataratas diabéticas e hiper maduras, submetidos ou não ao uso de azul de tripano a 0,1 % durante a cirurgia de remoção da catarata por facoemulsificação.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DALENTE DO CÃO

O cristalino do cão (lente) é uma estrutura biconvexa, com superfície anterior mais plana ou menos curva que a superfície posterior; tem consistência macia, é avascular, transparente e um tecido altamente estruturado de maneira a promover a refração dos raios luminosos que entram no olho para um ponto na retina. Essa estrutura é sustentada pelas zônulas lenticulares e o humor vítreo; se localiza em uma depressão no vítreo denominada fossa patelar; em cães, apresenta volume de aproximadamente 0,5 mililitros (ml), espessura anteroposterior de 7 milímetros (mm), diâmetro equatorial de 10 mm e poder de refração de 40 - 41 dioptrias. É composto pela cápsula, epitélio anterior, células lenticulares e substância fundamental amorfa, podendo o mesmo ser dividido em duas regiões gerais: o córtex (áreas externas próximas à cápsula) e o núcleo (áreas centrais) (BASHER; ROBERTS, 1995; GELATT, 2003; VAUGHAN; ASBURY; RIORDAN-EVA, 2003; SLATTER, 2005; PASCARETTA JR., 2007).

2.1.1 Cápsula lenticular

A cápsula é a lâmina basal do epitélio invertido (WINKLER et al., 2001), ou seja, uma matriz extracelular (ME) especializada sobre a qual se ancoram as células epiteliais da lente (Figura 1) (LEBLEU; MACDONALD; KALLURI, 2007; HAFTER et al., 2013).

Figura 1 – Eletromicrografia da cápsula lenticular (lc) discretamente separada do epitélio anterior da lente (cm)

Fonte: (DANYSH; DUNCAN, 2009).

A cápsula é, constituída por interações entre glicoproteínas de adesão (laminina), proteoglicanos (perlecan), fibras colágenas (IV e XVIII), entactina/nidogênio, sendo estes alguns de seus principais componentes estruturais (Figura 2) (YAN et al., 2005; TIMPL, 1989¹ apud WINKLER et al., 2001, p. 478; LEBLEU; MACDONALD; KALLURI, 2007; DANYSH; DUNCAN, 2009; NELSON; COX, 2011; HAFTER et al., 2013). Todos estes em conjunto com moléculas de água garantem a união, estabilidade e diferenciação das células que a compõe, sendo então responsáveis pela biomecânica da acomodação e pela difusão de substâncias através da lente, além de promover proteção contra infecções e isolamento dos demais tecidos oculares, o que garante seu privilégio imunológico (LEBLEU; MACDONALD; KALLURI, 2007; VOET; VOET; PRATT, 2008; DANYSH; DUNCAN, 2009; NELSON; COX, 2011).

¹ TIMPL, R. Structure and biological activity of basement membranes proteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 180, p. 478, 1989.

Figura 2 - Representação esquemática das interações de colágeno IV e laminina e, da ligação entre elas com nidogênio, perlecan e outras moléculas na cápsula lenticular

Fonte: (DANYSH; DUNCAN, 2009).

2.1.1 Composição da cápsula lenticular

2.1.1.1.1 Glicosaminoglicanos

É o conjunto de heteropolissacarídeos estruturais da cápsula que realizam e mediam interações moleculares entre laminina, colágeno IV, fibronectina e outras proteínas (BATTAGLIA et al., 1992; WINKLER et al., 2001; VOET; VOET; PRATT, 2008; DANYSH; DUNCAN, 2009; NELSON; COX, 2011). São moléculas responsáveis por promover elasticidade, resistência (BATTAGLIA et al., 1992; DANYSH; DUNCAN, 2009) e manter o teor hídrico dentro da lente (HAFTER et al., 2013).

O ácido hialurônico é o principal glicosaminoglicano não sulfatado que compõe a matriz (NELSON; COX, 2011). Além deste, pode-se encontrar glicosaminoglicanos menores e sulfatados, como o dermatansulfato, queratansulfato e heparansulfato que, diferentes do ácido hialurônico, encontram-se ligados às proteínas específicas para originar os chamados proteoglicanos (VOET; VOET; PRATT, 2008; NELSON; COX, 2011).

2.1.1.1.1 Heparansulfato

Heparansulfato é uma classe de moléculas longas, que fazem parte da estrutura central da lâmina basal e são responsáveis por promover a carga aniônica nas superfícies mais internas e externas da cápsula (WINKLER et al., 2001; ROSSI et al., 2003). Essas moléculas possuem a capacidade de se ligarem entre elas e com a laminina, colágeno IV, nidogênios e fibronectina (TIMPL; BROWN, 1996), podendo também ligar-se e servir de reservatório a diversos fatores de crescimento, tais como o fibroblástico (FGF), de hepatócitos (FGH) e derivados de plaquetas (PDGF), ou seja, todos os essenciais para o crescimento e desenvolvimento capsular (LOVICU; McAVOY, 1993).

2.1.1.1.2 Proteoglicanos

Os proteoglicanos são os principais componentes de todas as lâminas basais dos seres vivos. São caracterizados por macromoléculas formadas por uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos sulfatados da matriz ou da superfície celular, ligados ao ácido hialurônico, covalentemente unidos a uma proteína de membrana ou a uma proteína secretada (VOET; VOET; PRATT, 2008; NELSON; COX, 2011). São basicamente responsáveis pelo controle de diversas atividades celulares, tais como a ativação de fatores de crescimento, a migração e adesão celular, além da propagação de “informações” através das membranas plasmáticas (NELSON; COX, 2011).

2.1.1.1.2.1 *Perlecan*

É um proteoglicano composto basicamente por cadeias de heparansulfato (HANDLER; YURCHENCO; LOZZO, 1997), que se encontra incorporado ao arranjo estrutural principal da cápsula, ligado principalmente às integrinas, alguns tipos de colágeno, laminina, fibronectina e às interações de laminina-nidogênio (BATTAGLIA et al., 1992; DANYSH; DUNCAN, 2009).

2.1.1.1.2.2 *Nidogênio*

Nidogênio, também conhecido como entactina, é uma molécula de glicoproteína sulfatada estrutural, fundamental a todas as lâminas basais, capaz de ligar-se à laminina, ao colágeno IV e ao perlecan (TIMPL; BROWN, 1996; DANYSH; DUNCAN, 2009).

2.1.1.1.2.3 *Fibronectina*

Fibronectina é uma importante glicoproteína de adesão da ME que também pode ser encontrada em sua forma solúvel no plasma, sendo também produzida por macrófagos durante a inflamação e por células do epitélio anterior da lente (MURRAY; KEELEY, 1996). É componente fundamental durante o desenvolvimento da cápsula, mas apresenta-se em quantidades reduzidas e até mesmo ausentes em lentes de animais adultos (YAN et al., 2005). Liga-se tanto ao heparansulfato quanto ao colágeno IV, tanto quanto a diversos receptores de membrana das células lenticulares (JOHANSSON et al., 1997; DANYSH; DUNCAN, 2009). Alguns autores sugerem que a fibronectina funcione mais como uma unidade de sinalização do que como um componente estrutural da lâmina basal, desempenhando também algum papel na reparação de lesões lenticulares e na opacificação da cápsula posterior,

além de promover aderência e migração às células epiteliais (OHARAZAWA et al., 1999; DANYSH; DUNCAN, 2009).

2.1.1.1.2.4 Laminina

Laminina é a glicoproteína de adesão fundamental mais abundante na formação e desenvolvimento da lente no ser vivo (SMYTH et al., 1999; LEBLEU et al., 2007), que pode também ser encontrada em áreas onde há fibrose tecidual (LINNOLA et al., 2000). Por ligar-se ao colágeno IV, perlecan e nidogênio, desenvolve papel importante na estabilidade das lâminas basais que compõe (YAN et al., 2005; HAFTER et al., 2013). Existem 15 diferentes formas de laminina tecido-específicas que podem ser observadas em diferentes espécies e nos diferentes estágios de desenvolvimento da cápsula (LINNOLA et al., 2000; DANYSH; DUNCAN, 2009).

2.1.1.1.3 Fibras – Sistema Colágeno - Colágeno tipo IV

Colágeno tipo IV é uma proteína não fibrilar estável que compõe aproximadamente 50 – 80% da estrutura da cápsula lenticular e que, integrada à laminina, são responsáveis pela manutenção de sua forma durante o rápido desenvolvimento da lente, sua estabilidade e sua resistência às forças exercidas pelo corpo ciliar sobre ela (MURRAY; KEELEY, 1996; YAN et al., 2005; LEBLEU; MACDONALD; KALLURI, 2007; DANYSH; DUNCAN, 2009; HAFTER et al., 2013).

2.1.1.2 Espessura da cápsula lenticular

A avaliação da espessura capsular é importante no que diz respeito aos efeitos de doenças ou da idade sobre as propriedades biomecânicas e funcionais da lente (Krag; Andreassen, 2003; Barros et al., 2008).

Sabe-se que a espessura capsular aumenta com a idade, em diferentes regiões da lente, entre as espécies (Danysh; Duncan, 2009) e na presença de doenças como a diabetes (Barros et al., 2008). Na cápsula anterior do cão, pode ocorrer um aumento de 5 – 8 micrômetros (μm), diferente da humana, que aumenta apenas 0,08 μm com o avançar da idade. A cápsula de uma pessoa de aproximadamente 65 anos mede apenas 8,65 μm , enquanto um cão de 14 anos pode apresentar 137 μm de espessura (Bernays; Peiffer, 2000). Apesar destas variações, a zona equatorial e a cápsula anterior da lente geralmente se mantêm 5 a 10 vezes mais espessas do que a cápsula posterior (Krag; Andreassen, 2003). No cão adulto, por exemplo, a cápsula anterior apresenta 50 – 70 μm de espessura no centro e aproximadamente 8 - 12 μm em seu equador, já a cápsula posterior, mede apenas 2 – 4 μm de espessura (Basher; Roberts, 1995; Glover; Constantinescu, 1997; Slatter, 2005). Entretanto, alguns autores ainda sugerem que, na catarata diabética, as cápsulas anterior e posterior tendem a se afinarem com a intumescência da lente (Gelatt, 2003).

2.1.1.3 Difusão através da cápsula lenticular

Em razão de a lente ser avascular, seu metabolismo é precário e depende constantemente da composição e difusão de componentes do humor aquoso e vítreo através da cápsula (Basher; Roberts, 1995; Slatter, 2005; Danysh; Duncan, 2009). Além disso, o transporte das moléculas é dependente de seu tamanho e carga, já que o colágeno IV forma uma “tela de filtração” pela estrutura que compõe e o heparansulfato com os grupos carboxila, mantêm um gradiente aniônico dentro dela (Winkler et al., 2001).

Transporte passivo de oxigênio e alguns metabólitos (glicose, água, sais minerais e gás carbônico), através da cápsula para o interior da lente, garantem a produção e diferenciação contínua de células lenticulares, além da manutenção da elasticidade e de sua transparência (SLATTER, 2005; COULOMBRE et al., 1979² apud DANYSH; DUNCAN, 2009, p. 1572). A maior parte do oxigênio necessário é proveniente do humor aquoso e é consumida pelo epitélio anterior e células lenticulares (SLATTER, 2005). Já a glicose, entra por difusão e por transporte assistido a partir do aquoso para fornecer a maior parte da energia requerida pela lente; se mantendo na concentração de aproximadamente 10% daquela observada no sangue e no humor aquoso (BAGLEY; LAVACH, 1994).

Glicólise aeróbia ocorre pelo ciclo do ácido cítrico e se limita às mitocôndrias das células epiteliais. Devido à baixa tensão de oxigênio e à ausência de mitocôndrias nas fibras da lente, a maioria da glicose (70%) é quebrada anaerobicamente em ácido láctico via ciclo de Embden-Meyerhof, que é regulado pelas enzimas hexoquinase e fosfofrutoquinase. Uma menor quantidade de glicose é metabolizada pela hexosemonofosfato, que também depende da hexoquinase para controlar seu metabolismo. Existe uma via, menos significativa, que converte a glicose em frutose via ciclo do sorbitol (BASHER; ROBERTS, 1995; VAUGHAN; ASBURY; RIORDAN-EVA, 2003; SLATTER, 2005).

Moléculas de tamanho intermediário são transportadas ativamente através da cápsula, como as proteínas presentes no humor aquoso e vítreo, necessárias para o crescimento e desenvolvimento normal da lente; ou como as produzidas pelo metabolismo lenticular, como no caso das uveítes faco-induzidas, comuns nas cataratas hiper maduras em cães (VAN der WOERDT, 2000). De maneira quantitativa, a taxa de difusão deste tipo de molécula também depende de seu peso molecular e de sua carga, já que as de cargas mais negativas são menos capazes de se difundir do que as demais de mesmo tamanho e peso molecular. Além disso, sabe-se que a taxa de difusão dessas moléculas diminui com o decorrer da idade (DANYSH; DUNCAN, 2009).

² COULOMBRE, A. J. Cataractogenesis: developmental inputs and constraints. **Ophthalmology**, v. 86, p. 1559-1570, 1979.

2.1.1.4 Propriedades biomecânicas da cápsula

As propriedades materiais e estruturais variam em diferentes locais da cápsula e também diminuem ao longo da vida, mesmo assim, a cápsula anterior se mantém, devido à sua espessura, 3 a 7 vezes mais resistente e rígida do que a posterior. Diferente da resistência, a elasticidade e a capacidade viscoelástica diminuem com a idade, tanto na cápsula anterior quanto na posterior (KRAG; ANDREASSEN, 2003).

2.1.1.4.1 Fenômeno de acomodação

Nos animais domésticos, os mecanismos de acomodação são pouco desenvolvidos, assim como o músculo ciliar. A córnea é a real superfície refrativa do olho e principal responsável pelo seu poder óptico. A lente é responsável pelo restante e pelo ajuste fino para objetos a diferentes distâncias (SLATTER, 2005).

Zônulas lenticulares, ou ligamentos suspensórios (fibras colágenas que aderem a cápsula lenticular ao corpo ciliar), sustentam a lente em seu equador. Alterações na tensão dessas fibras modificam a curvatura das superfícies lenticulares e, assim, seu poder óptico, realizando o fenômeno da acomodação. Durante a acomodação, a contração da musculatura ciliar relaxa as zônulas, a elasticidade natural da cápsula faz com que a lente se torne mais esférica, aumentando o poder óptico (acomodando a visão para objetos próximos) (GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

2.1.2 Cápsula anterior

A cápsula anterior desempenha papel fundamental na regulação, adesão, diferenciação, permeabilidade e filtração de substâncias, polaridade epitelial e no

crescimento celular das fibras lenticulares (YURSHENCO; SCHITTNY, 1990; LEBLEU; MACDONALD; KALLURI, 2007).

Importante na cirurgia de catarata sofre alterações importantes na presença de doenças e com o avançar da idade, tais como a perda de quantidade e do arranjo de suas moléculas estruturais (WINKLER et al., 2001), perda da elasticidade e de sua força mecânica (MARSHALL et al., 1992), diminuição na composição de água (YANG et al., 1998), além do aumento de sua espessura, independente da presença de catarata (BERNAYS; PEIFFER, 2000).

É morfollogicamente homogênea, podendo apresentar aspecto granular em sua face mais externa (humoral), devido à maior concentração dos glicosaminoglicanos e proteoglicanos (CAMMARATA et al., 1986; LOVICU; McAVOY, 1993; LANDEMORE et al., 1999; WINKLER et al., 2001), sugerindo que tal composição molecular possa desempenhar papel fundamental na manutenção de sua estrutura e função (WINKLER et al., 2001).

2.1.3 Epitélio lenticular

Células epiteliais cubóides se localizam abaixo da cápsula anterior e das células colunares abaixo do equador, onde se formam novas fibras lenticulares ao longo de toda vida. O metabolismo da glicose sustenta a atividade mitótica desta área, o que deixa as células suscetíveis às influências tóxicas e mórbidas, as quais podem se tornar aparentes como opacidades equatoriais. O epitélio é responsável pela proteção das fibras lenticulares subjacentes contra a radiação ultravioleta e o estresse oxidativo, pelo transporte de cátions através da cápsula (BASHER; ROBERTS, 1995; SLATTER, 2005; KUMAMOTO et al., 2007) e pela produção, organização e deposição dos componentes da lâmina basal na cápsula lenticular (JOHNSON; BEEBE, 1984; YAN et al., 2005).

Assim como na lente humana, no desenvolvimento da catarata, as células epiteliais da lente do cão podem sofrer metaplasia e alterar a estrutura e composição da cápsula (YAN et al., 2005). Estudos realizados anteriormente observaram por microscopia eletrônica, que cápsulas colhidas após a capsulorrexe de cães com catarata podem apresentar superfície posterior duplicada, sem epitélio, com epitélio metaplásico, com a presença de uma camada de células pleomórficas, ou mesmo apresentar apenas a deposição de colágeno e algumas vezes de fibronectina, mas todas formando uma matriz extracelular desorganizada (BERNAYS; PEIFFER, 2000; COLITZ et al., 2000). Além disso, tal metaplasia do epitélio pode promover a formação de um tecido fibroso com lâmina basal ectópica (placas subcapsulares), que pode resultar em distorção significativa da estrutura da cápsula, observado na microscopia óptica pela presença de dobras evidentes, além do aumento de toda a sua estrutura capsular, podendo chegar a 15 - 30 μm de largura e 5 - 10 μm de espessura (BERNAYS; PEIFFER, 2000), alterações estas que podem prejudicar o sucesso cirúrgico e/ou promover a opacidade da cápsula posterior (COLITZ et al., 2000).

Estudos realizados em pacientes humanos diabéticos observaram que, além das alterações citadas, pode ocorrer uma redução na densidade de células epiteliais devido ao aumento da quantidade de aldose redutase circulante. Observou-se também, que tais alterações não interferem na velocidade ou no surgimento da catarata e ainda sugere o uso de inibidores de aldose redutase para prevenir a perda das células epiteliais da lente, o que já foi provado em ratos em estudo anterior (TAKAMURA et al., 2003; KUMAMOTO et al., 2007).

2.1.3.1 Processos de morte celular no epitélio lenticular

A apoptose e a autofagia ocorrem, fisiologicamente, no processo de formação da lente e na manutenção da transparência (ZANDY et al., 2005; CAO; KLIONSKY, 2007; FROST et al., 2014), quando há estresse oxidativo decorrente da idade avançada; na presença de doenças de bases imunológicas (ZANDY et al., 2005) e também em ocasiões onde há lesão celular, como na depleção de fatores de

crescimento e na invasão de patógenos (CAO; KLIONSKY, 2007; FROST et al., 2014).

A apoptose pode ocorrer por uma via intrínseca (mitocôndria-dependente) ou extrínseca (receptor-dependente) (CORY, 1995). A via intrínseca pode ocorrer pela via do citocromo-C, que ativa a Caspase-9 e posteriormente a 3, que é a real efetora deste tipo de morte celular (MOHAMAD et al., 2013). A autofagia, por sua vez, ocorre basicamente pela ação de lisosimas no citosol celular, que realizam a degradação proteolítica que levará à morte celular (FROST et al., 2014).

O aumento da expressão de diversos fatores de apoptose (Caspase-9 e 3) e autofagia (Beclina-1) no epitélio lenticular foi observado em estudos anteriormente realizados, em pessoas idosas submetidas à remoção de catarata com o uso de azul de tripano, um corante frequentemente utilizado durante a cirurgia (PORTES et al., 2010); e em pessoas apresentando cataratas de diferentes tipos, tais como a cortical e a diabética, sendo observado a maior expressão destes fatores na presença de catarata diabética e retinopatia diabética (KIM et al., 2012; JUNG et al., 2013; MOHAMAD et al., 2013).

2.1.4 Células da lente e substância fundamental amorfa

A proliferação (mitose) e o alongamento das células epiteliais do equador em direção ao centro da lente formam as fibras que constituem o córtex e envolvem todo o núcleo. Como estas fibras não alcançam de um pólo ao outro da lente, ou mesmo toda a sua circunferência, elas se unem em suturas nas suas faces anteriores e posteriores, apresentando o formato de “Y”. As células (fibras) são dispostas em camadas interdigitais e são mantidas ancoradas à substância cimento amorfa (GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; SLATTER, 2005).

O núcleo, composto por células mais velhas, apresenta fibras mais densas e menos transparentes do que as células mais jovens que constituem o córtex. Com o avançar da idade, a proliferação das células lenticulares forçam as células do núcleo em direção ao centro da lente. Estas se tornam mais densas e duras com o aumento da proximidade entre as células. Em cães com cerca de 6 anos de idade, essa

densidade nuclear aumentada causa turvação azul-acinzentada, conhecida como esclerose nuclear (SLATTER, 2005).

2.1.4.1 Transparência

A transparência dentro da lente é mantida por vários fatores complexos: um citoplasma de baixa densidade (pela ausência de núcleo e organelas intracelulares das fibras lenticulares), com pequenas flutuações espaciais em seu índice de refração citoplasmático e um arranjo de lamelas altamente organizado que, se alterado, pode alterar seu índice refrativo (BASHER; ROBERTS, 1995; GELATT, 2003).

2.2 FISIOPATOLOGIA DA CATARATA

Catarata, uma das causas mais freqüentes de cegueira em cães (MARTIN, 2005), é definida como qualquer grau de opacidade do cristalino ou de sua cápsula (DAVIDSON; NELMS, 2007), podendo ser classificada de acordo com seu estágio de desenvolvimento, sua etiologia, localização, idade do surgimento e consistência (SLATTER, 2005; OFRI, 2008).

Quanto ao estágio de desenvolvimento, pode ser dividida em incipiente, imatura, madura, hipermadura, intumescente e morganiana. A catarata incipiente caracteriza-se pela opacidade inicial da lente com visão inalterada; na imatura, a opacidade é mais marcada, mas incompleta e a fundoscopia ainda pode ser realizada, pois o reflexo tapetal ainda é visível, mas a visão já está comprometida; na madura, a lente se encontra opaca por completo e o fundo não pode mais ser oftalmoscopicamente observado. Muitas vezes a catarata madura pode estar intumescente. A catarata intumescente ocorre quando a lente aumenta de volume, como na catarata secundária à diabetes em cães. Finalmente, a catarata hipermadura caracteriza-se pela reabsorção e/ou liquefação da lente (morganiana). Nesta fase

ocorre também o aumento da câmara anterior e o enrugamento da cápsula, além do maior risco de desenvolvimento de uveítes faco-induzidas e glaucoma secundário (SLATTER, 2005).

Quanto à etiologia, pode-se dividir a catarata em diferentes tipos: espontânea (hereditária/genética), diabética, congênita, secundária ao trauma, à uveítes, à degeneração retiniana, entre outras (SLATTER, 2005).

Os mecanismos da formação da catarata espontânea nos animais domésticos, com suposta origem hereditária, são ainda imperfeitamente compreendidos (SLATTER, 2005). Por outro lado, sabe-se que a fisiopatologia da catarata diabética em cães associa-se com uma série de eventos relacionados às alterações nas bombas metabólicas, ao conteúdo proteico do cristalino, às concentrações iônicas e à atividade antioxidante da lente (GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; WINKLER et al., 2001; GELATT, 2003).

2.2.1 Fisiopatologia da catarata diabética

Com os níveis de glicose sanguínea elevados, os níveis de glicose na lente aumentam e o metabolismo anaeróbico da glicose pelas vias da hexoquinase torna-se saturado, ocasionando um desvio para uma via alternativa de energia que envolve a enzima aldose redutase (AR). A atividade da AR na catarata diabética é aumentada principalmente pelo aumento dos seus níveis e de sua ativação. Utilizando a forma reduzida da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADPH), a AR reduz a forma aldeído da glicose para sorbitol (um poliol ou álcool de açúcar), o qual não se difunde prontamente através da cápsula da lente, mas que será lentamente metabolizado em frutose, substância capaz de atravessar a membrana celular (KEEN; JARRETT, 1975; BASHER; ROBERTS, 1995; GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

A não difusão do sorbitol através da cápsula promove a formação de um gradiente osmótico no interior da lente. Água do humor aquoso é então embebida para dentro da lente iniciando sua turgescência, o que prejudica a permeabilidade das membranas celulares e provocam uma série de reações bioquímicas que resultam em alterações irreversíveis na arquitetura e configuração da lente. Ocorre então um aumento do volume lenticular, o rompimento das fibras e a formação de vacúolos, evidenciando clinicamente a catarata diabética inicial, geralmente observada nas células epiteliais, onde se concentra a maior parte do sorbitol (KEEN; JARRETT, 1975; BASHER; ROBERTS, 1995; SLATTER, 2005).

Alterações vacuolares equatoriais precoces podem algumas vezes dissipar-se após a terapia com insulina, mas alterações de cataratas substanciais (como na diabetes canina), não são reversíveis com o controle da glicemia (GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

Posterior degradação de proteínas em aminoácidos e polipeptídeos, principalmente nos estágios mais avançados da catarata, permite a difusão de pequenos produtos da proteólise da lente para o humor aquoso, além da perda de água e material nitrogenado, resultando na reabsorção e no encolhimento da lente (GELATT, 2003; SLATTER, 2005). A reabsorção da catarata diabética, com controle da uveíte faco-induzida, foi observada por Safatle et al. (2000), em 5 cães após 4 - 12 meses do diagnóstico inicial da catarata.

2.2.1.2 Os efeitos da diabetes na cápsula lenticular

Hiperglicemia crônica, como na diabetes não controlada, pode resultar em ligações químicas iônicas e/ou covalentes, intra e intermolecular (*cross-linking*) de grupos lisina, conhecido como glicação não enzimática, que pode alterar a estrutura e as propriedades biomecânicas da lâmina basal (BAILEY et al., 1993), além de prejudicar suas vias de sinalização (BAILEY et al., 1993; HONG et al., 2000). O lento *turn-over* que ocorre nas moléculas da cápsula no paciente diabético, também a torna extremamente suscetível aos efeitos acumulativos dos *cross-linkings*, podendo alterar sua estabilidade e deixando-a mais rígida (BAILEY et al., 1993). Barros et al.

(2008) observaram também que há um aumento na sua espessura em cães apresentando catarata diabética.

2.2.2 Velocidade da progressão

A velocidade da progressão, bem como a prevalência das cataratas espontâneas é indefinida. Por outro lado, sabe-se que a formação das cataratas diabéticas relaciona-se diretamente com a glicemia, idade do animal e a concentração de AR lenticular, que é espécie-dependente. A atividade da AR canina é similar àquela na lente humana (0,39 nm/min por 1 mg de proteína da lente), três vezes menor que as da lente do rato e é maior que a da lente do camundongo, o qual apresenta níveis quase indetectáveis (GELATT, 2003); mesmo assim, as cataratas diabéticas em cães geralmente apresentam evolução rápida, bilateral e independente da administração da insulina; entretanto, se a glicemia estiver controlada, pode ser de evolução lenta. A maioria dos cães diabéticos (75%) apresenta catarata em até 12 meses após o diagnóstico da doença (BEAM; CORREA; DAVIDSON, 1999; SAFATLE et al., 2000; SLATTER, 2005).

2.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA

A sintomatologia da baixa de visão ocasionada pela catarata só é observada quando o cão apresenta dificuldade em transpor objetos desconhecidos, fica hesitante em ambientes estranhos, recusa mover-se, julga incorretamente o percurso de uma bola, anda de encontro com paredes e outros objetos ou fica mais próximo do proprietário durante os passeios (SLATTER, 2005).

A primeira manifestação notada pelos proprietários de cães diabéticos é a perda repentina da visão pelo rápido desenvolvimento da catarata, antes mesmo de se iniciarem as alterações sistêmicas clássicas da doença, como poliúria e polidipsia (BASHER; ROBERTS, 1995; SLATTER, 2005).

2.3.1 Exame oftálmico

O exame oftálmico inicial de cães com catarata inclui o teste de Schirmer, a biomicroscopia com lâmpada de fenda e a tonometria (SLATTER, 2005).

Com biomicroscópio em lâmpada de fenda ou fonte focal de luz branca, a íris é examinada para mobilidade anormal e a câmara anterior quanto à profundidade. A catarata intumescente e a tumefação inicial do vítreo na catarata diabética empurram a lente para frente, resultando em uma câmara anterior rasa, motivo pelo qual a gonioscopia também pode ser indicada, principalmente nas raças com predisposição ao glaucoma primário. A câmara anterior é examinada para sinais de uveíte faco-induzida, tais como o escurecimento da íris, sinéquia posterior, flare, precipitados ceráticos e hipópio (BASHER; ROBERTS, 1995; GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

A tonometria de aplanção também deve ser realizada, pois outro sinal de uveíte faco-induzida é a diminuição da pressão intraocular (PIO) (menor do que 12 milímetros de mercúrio - mmHg) (BASHER; ROBERTS, 1995; LEASURE; GELATT; MACKAY, 2001; GELATT, 2003; SLATTER, 2005). Um estudo de Leasure, Gelatt; Mackay (2001) observou importante variação na PIO dos olhos de cães com catarata, principalmente entre as fases imaturas e hiper maduras (imaturas: 3 – 27 mmHg; hiper maduras: 4 - 23 mmHg), mas sem relevância clínica significativa.

Tropicamida 1% é instilada após o exame inicial para observação total da lente. A midríase adequada deve ser observada após 20 minutos, já que, o primeiro sinal da uveíte faco-induzida, segundo alguns autores, é a resistência pupilar à midríase após sua instilação (BASHER; ROBERTS, 1995; SLATTER, 2005).

A lente é primeiramente observada por biomicroscopia com lâmpada de fenda (SLATTER, 2005). Geralmente, a catarata diabética nos cães é diagnosticada como intumescente (madura ou hiper madura) e difere da catarata espontânea (Figura 3a) por apresentar nítida visibilização da separação da sutura das fibras lenticulares nas junções das fibras, conhecida como “Y” (Figura 3b) (BASHER; ROBERTS, 1995).

Figura 3 - a. Observação da opacidade total do cristalino em um cão não diabético, com catarata madura, após a instilação de colírio midriático. Observar também a intensa congestão conjuntival; b. Observação da sutura em “Y” (seta), na lente de um cão com catarata diabética

Fonte: Serviço de Oftalmologia – HOVET – USP.

Outra avaliação a ser realizada, é o posicionamento da lente dentro do olho. Se as zônulas se deteriorarem ou soltarem da lente, uma rápida movimentação do olho fará com que a lente oscile na fossa patelar (facodoneze). Essa oscilação provoca a vibração da íris (iridodoneze) e altera proporcionalmente sua posição. A iridodoneze é um sinal precoce de deslocamento lenticular iminente e se torna mais evidente conforme a lente vai se soltando das zônulas restantes. Fibrilas vítreas flutuando através da pupila, no humor aquoso, também pode ser um sinal de ruptura zonular e futura luxação anterior (GELATT, 2003).

2.4 TRATAMENTO DA CATARATA

Para melhor entendimento, o tratamento da catarata foi dividido em tópicos a seguir:

2.4.1 Pré-operatório

Como o tratamento cirúrgico da catarata é eletivo, a seleção apropriada do paciente e avaliação pré-operatória são cruciais para um bom resultado cirúrgico (BASHER; ROBERTS, 1995; GELATT, 2003).

Diversos autores como Dziezyc (1990); van der Woerdt, Wilkie e Myer (1993); Basher e Roberts (1995); Glover e Constantinescu (1997); Gelatt (2003) e Slatter (2005), citam como pré-requisitos cirúrgicos:

- Ciência do proprietário quanto aos custos e esforços necessários para a realização do tratamento;
- A uveíte faco-induzida deve ser diagnosticada e tratada antes da intervenção cirúrgica para evitar posteriores complicações;
- Oftalmoscopia deve ser realizada, quando possível e eletrorretinograma (ERG) solicitado para garantir boa função retiniana e melhorar o prognóstico visual;
- Ultrassonografia modo B também deve ser realizada, requerendo-se maior atenção ao vítreo e à retina periférica e dorsal (para descolamentos de retina);
- Nenhum outro processo mórbido ocular como ceratite, ceratoconjuntivite seca, uveíte, glaucoma, subluxação da lente e degeneração ou descolamento retiniano devem estar presentes;
- Bom estado geral deve ser avaliado pelos exames de hemograma completo, perfil bioquímico, eletrocardiograma e radiografias torácicas em duas posições.

Ceratometria e ultrassonografia modo A (biometria), as quais são necessárias para o cálculo do poder dióptrico de lentes intraoculares (LIO), também podem ser importantes considerações pré-operatórias se o implante de LIO for indicado (GELATT, 2003).

Alguns autores sugerem que o controle completo da diabetes canina não é necessário no pré-operatório, uma vez que a demora pode permitir a evolução da uveíte faco-induzida, a qual pode ser rápida e agressiva em cães diabéticos. Outros acreditam que o controle glicêmico é fundamental antes da cirurgia. Em geral, pacientes diabéticos são bons candidatos à cirurgia de catarata, desde que sejam livres de complicações como cistite, cetoacidose e falência renal ou hepática, mas é preferível que o paciente esteja com a glicemia controlada e exame para hiperadrenocorticismismo seja realizado quando indicado (DZIEZYC, 1990; BASHER; ROBERTS, 1995; SLATTER, 2005).

2.4.2 A cirurgia

A facectomia extracapsular por facoemulsificação (FACO) é a técnica cirúrgica de eleição para a maioria dos oftalmologistas veterinários, já que necessita de pequena incisão, promove condições operatórias mais controladas, pode não necessitar de sutura, apresenta rápida cicatrização com menor grau de distorção da córnea e reduzida inflamação intraocular pós-operatória, tudo isto contribuindo para uma reabilitação visual mais rápida. Contudo, a técnica ainda apresenta algumas desvantagens: o custo elevado do aparelho, dificuldade da técnica, além do risco de deslocamento de material nuclear através de rupturas na cápsula posterior (GELATT; GELATT, 2001; VAUGHAN; ASBURY; RIORDAN-EVA, 2003).

2.4.2.1 FACO

A técnica de FACO consiste na remoção cirúrgica da catarata utilizando um aparelho capaz de realizar fragmentação ultrassônica e aspiração da lente através de uma pequena incisão na córnea, mantendo a pressão intraocular constante pelo sistema de irrigação que apresenta (GELATT; GELATT, 2001).

A técnica apresenta diversas variações, mas basicamente consiste em uma sequência de procedimentos passodependentes, que se inicia após posicionamento do paciente em decúbito lateral sob o microscópio cirúrgico e realização da cantotomia lateral (se necessária), para melhor exposição do olho. Logo após, incisão de aproximadamente 3 mm na região próxima ao limbo superior é realizada, seguida da injeção de corante para a cápsula anterior e viscoelástico na câmara anterior. A cápsula anterior é então removida (capsulorrexe). A capsulotomia deve ser aproximadamente, 2 - 3 mm menor que o diâmetro óptico. Hidrodissecção é realizada entre a cápsula anterior e o córtex lenticular. Uma nova incisão acessória da córnea pode ser realizada. Procede-se com a fragmentação ultrassônica da lente e aspiração das partes produzidas durante a facoemulsificação. A técnica de “dividir e conquistar” é uma das mais realizadas por oftalmologistas médicos e veterinários. Material cortical residual da lente é então removido. Após, realiza-se o fechamento das feridas cirúrgicas (ceratorrafia e cantorrafia) com pontos simples isolados (GWIN et al., 1983; DAVIDSON et al., 1990; GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; GELATT; GELATT, 2001; BARROS et al., 2003; GELATT, 2003).

2.4.2.1.1 Capsulorrexe

A capsulorrexe consiste na excisão da cápsula anterior da lente, um dos passos mais importantes, difíceis e delicados de uma FACO sem complicações, já que cápsula é fina, elástica (BASHER; ROBERTS, 1995; GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; GELATT; GELATT, 2001; SLATTER, 2005) e o reflexo de fundo comprometido pela catarata dificulta a visibilização e delimitação de suas bordas. A capsulorrexe circular contínua (CCC) é a técnica de escolha dos cirurgiões oftalmologistas, por ser simples, de fácil realização e apresentar menor índice de rasgadura para o equador da lente. Além disso, com o objetivo de facilitar o procedimento, diferentes corantes de cápsula podem ser utilizados, como fluoresceína, indocianina verde e azul de tripano (AT), entre outros (GELATT; GELATT, 2001; WOLLENSAK; SPORL; PHAM, 2003; OZTURK; OSHER, 2006; DICK; ALIYEVA; HENGERER, 2008).

2.4.2.1.1.1 Azul de tripano

Azul de tripano é o corante mais rotineiramente utilizado antes da capsulorrexe, pois promove coloração mais escura que os demais corantes, permanece na cápsula durante todo o procedimento cirúrgico e é econômico, já que 0,1 ml é suficiente para garantir a coloração (WOLLENSAK; SPORL; PHAM, 2003; OZTURK; OSHER, 2006; DICK; ALIYEVA; HENGERER, 2008). Além de melhorar a visibilização dos limites da cápsula durante o procedimento cirúrgico, o azul de tripano também promove redução da elasticidade e aumento da rigidez capsular, o que facilita a CCC (WOLLENSAK; SPORL; PHAM, 2003; DICK; ALIYEVA; HENGERER, 2008).

Além das referidas qualidades do corante, estudos em humanos e coelhos demonstraram que a utilização do azul de tripano não apresenta qualquer toxicidade para o segmento anterior (CHANG et al., 2005) e posterior do bulbo ocular (RODRIGUES et al., 2009), entretanto, quando utilizado em maior concentração, pode ser bastante deletério para algumas estruturas do segmento posterior (KODJIKIAN et al. 2005). Em humanos, por exemplo, foi observado que 0,1 ml do corante a 0,0125%, quando aplicado durante 30 segundos sobre a cápsula anterior do cristalino, é tóxico para as células epiteliais da lente, podendo diminuir sua densidade, viabilidade (NANAVATY et al., 2006) e até induzir a morte celular (PORTES et al., 2010).

Portes et al. (2007) avaliaram as alterações subcelulares nas células do cristalino não corado e corado com azul de tripano a 0,1% por microscopia eletrônica de transmissão e observaram que, todos os cristalinos estudados apresentavam dois tipos de células epiteliais, uma com citoplasma mais eletrodense e aparentemente mais mitocôndrias do que a outra, que apresentou aspecto citoplasmático mais eletrolucente; e que apesar das diferenças, ambas as células de todas as amostras coradas apresentaram alterações no perfil nuclear, mitocôndrias com retículo endoplasmático rompido, não visibilização das cristas mitocondriais, além do aumento da eletrodensidade citoplasmática.

Portes et al. (2010) também identificaram pelas análises estatísticas das eletromicrografias realizadas, que a relação núcleocitoplasmática foi menor no grupo

controle (sem corante), quando comparada ao grupo exposto ao corante, assim como a menor proporção entre os eixos perpendiculares dos núcleos.

Análises imunohistoquímicas da expressão de Beclina-1 comprovaram a presença de morte celular por autofagia no grupo de células do epitélio do cristalino coradas pelo azul de tripano. Utilizando-se da técnica TUNEL (TdT dUTP-biotin Nick End Labeling), também foi evidenciada a morte celular por apoptose nas células dos cristalinos submetidos a referida técnica. Nenhuma das alterações citadas foi observada no grupo de cápsulas não coradas. Os autores também referem que não foi observada nenhuma alteração estrutural nas avaliações por microscopia óptica em nenhum dos grupos (PORTES et al., 2010).

Sugere-se ainda, que as referidas alterações observadas nos diversos estudos, possam contribuir para a prevenção da opacificação secundária da cápsula posterior (OCP), complicação frequentemente observada após a cirurgia para remoção da catarata (NANAVATY et al., 2006; PORTES et al., 2007; PORTES et al., 2010; KIM et al., 2012; JUNG et al., 2013; MOHAMAD et al., 2013).

2.4.3 Complicações pós-operatórias

As principais complicações pós-operatórias da remoção cirúrgica da catarata incluem opacificação da cápsula posterior, uveíte, hipertensão ocular transitória, glaucoma, descolamento de retina, endoftalmite, úlceras de córnea, edema corneal e deiscência dos pontos (SLATTER, 2005; SIGLE; NASSISSE, 2006).

As complicações cirúrgicas em longo prazo pós-FACO foram observadas em estudo realizado por Sigle; Nassisse (2006). A mais comum foi a opacificação da cápsula posterior; descolamento de retina e glaucoma foram raramente observados (1 - 2 %); além disso, a perda da visão foi observada em menos de 10% dos animais até 3 anos após a cirurgia. Bouhanna (2003) observou que 87% dos olhos de cães diabéticos recuperaram a visão após a FACO e que as principais complicações observadas foram: uveíte crônica (35%), sinéquia posterior (22%), opacidade de cápsula posterior (20%), edema de córnea (14%), descolamento de retina (5%) e glaucoma (2%).

2.4.3.1 Opacificação da cápsula posterior

É a complicação pós-operatória mais frequentemente diagnosticada, principalmente nos cães jovens, de pequeno e médio porte e com catarata imatura (DZIEZYC, 1990; VAUGHAN; ASBURY; RIORDAN-EVA, 2003; BRAS et al., 2006; SIGLE; NASSISSE, 2006).

De acordo com Bagley; Lavach (1994) foi observado que a opacificação de cápsula posterior ocorreu em 67% dos cães não diabéticos e 68% dos diabéticos após a FACO, mas nenhum cão apresentou significativa baixa de visão por conta desta complicação (Figura 4).

Figura 4 - Opacidade de cápsula posterior observada em olho esquerdo sob midríase medicamentosa, em um cão macho, 7 anos, sem raça definida, após 3 meses da FACO. Observar a possível visibilização do fundo de olho (tapetum – coloração amarelo-esverdeada e região não-tapetal – marrom-avermelhada), o que permite sugerir o não comprometimento da visão

Fonte: Serviço de Oftalmologia – HOVET – USP.

A opacificação da cápsula posterior pode ocorrer: por resíduos de material subcapsular, pela fibrose capsular, pela técnica cirúrgica realizada e, principalmente, pela migração das células do epitélio da lente para a cápsula posterior, onde podem inchar e tornarem-se globulares, passando a serem conhecidas como *Elschnig's pearls*. Os mecanismos propostos para tal proliferação incluem a metaplasia e diferenciação destas células, que além de se tornarem capazes de produzir nova lâmina basal, tornam-se também miofibroblásticas. A habilidade de expressar a actina do músculo liso α (α -SMA) é então adquirida, promovendo certa contratilidade, a qual é a real responsável pelo “enrugamento” (opacidade) da cápsula posterior. A nova MEC produzida, composta agora por diferentes tipos de colágeno, acaba por consolidar a opacidade e a fibrose capsular (GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; BRAS et al., 2006; POT et al., 2009; CHANDLER et al., 2012; WORMSTONE; WANG; LIU, 2009; JOSHI, 2013).

Sabe-se também que a transferrina e o aumento (pelo próprio estímulo do procedimento cirúrgico) da liberação de fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento transformador β 2 (TGF- β 2) e o FGF, também estão associados a esta complicação em cães; que a presença de LIO previne a sua ocorrência e que a opacidade também pode se apresentar na forma progressiva em cães diabéticos ou saudáveis, mesmo antes da remoção cirúrgica da catarata (GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; BRAS et al., 2006; POT et al., 2009; WORMSTONE; WANG; LIU, 2009; CHANDLER et al., 2012; TIWARI; RAM; LUTHRA-GUPTASARMA, 2014).

O tratamento indicado para OCP em humanos é a capsulotomia com Neodymium-YAG laser. A técnica é indicada quando ocorrer diminuição da acuidade visual, diplopia monocular ou dificuldade na realização da fundoscopia. No cão, alguns fatores são responsáveis pelo baixo sucesso desta técnica: a cápsula posterior do cão ser menos elástica que a humana; necessidade de maior quantidade de disparos para provocar a mesma abertura na cápsula e a dificuldade em julgar a acuidade visual nestes animais (DZIEZYC, 1990).

Complicações do uso do laser citadas em humanos são o aumento transitório da PIO, herniação vítrea, descolamento de retina e edema macular cistóide. Em cães, a única complicação observada foi a uveíte transitória (KANSKI, 1989; DZIEZYC, 1990).

Capsulotomia cirúrgica manual é indicada quando não houver o laser; quando existir opacidade de córnea que impossibilite o foco do aparelho, ou na presença de cápsula lenticular opaca pela presença de material cortical (KANSKI, 1989).

OBJETIVOS

3 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar a cápsula anterior e seu epitélio, em cães apresentando cataratas agressivas, tais como a diabética (intumesciente) e hipermadura (não diabética), após terem sido submetidos à cirurgia de remoção da catarata por facoemulsificação, utilizando-se ou não de azul de tripano a 0,1 %.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Selecionar os cães recrutados para o estudo, pelos exames clínicos sistêmicos e oftálmicos, para compor os diferentes grupos.
2. Avaliar a morfologia das amostras, pela coloração de rotina de hematoxilina-eosina (HE) quanto: a espessura do epitélio, da cápsula anterior e a relação entre o epitélio/cápsula (espessura relativa mínima de epitélio).
3. Avaliar, pela técnica histoquímica de ácido periódico de Schiff (PAS), as quantidades de proteoglicanos nas cápsulas dos diferentes grupos.
4. Avaliar, pela técnica histoquímica de *picrosirius red*, a quantidade de colágeno IV nas cápsulas.
5. Analisar pela técnica de imunofluorescência, a expressão da Caspase – 3, como marcador de processo de morte celular programada por apoptose e de Beclina – 1, como marcador de processo de morte celular por autofagia, ambas realizadas nas células do epitélio anterior nos animais estudados, submetidos ou não ao uso de azul de tripano a 0,1 %.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ - USP), sob número de protocolo: 2964/2013.

Foram incluídos no estudo cães com catarata, diabéticos e não diabéticos, machos ou fêmeas, de 8 a 12 anos. Os cães não diabéticos apresentaram estritamente catarata do tipo hipermadura e, os diabéticos, apenas catarata intumescente decorrente a doença.

Como critérios de exclusão estabeleceram-se o histórico de trauma, uveítes (agudas ou crônicas) e/ou glaucoma no olho a ser operado; qualquer outro tipo de catarata que não a hipermadura e intumescente secundária a diabetes; a presença de quaisquer outras doenças, tanto oftálmicas quanto sistêmicas e a administração de medicações, tanto tópicas quanto sistêmicas, que pudessem comprometer o processo de formação das cataratas ou causar alterações estruturais à cápsula anterior da lente e/ou ao seu epitélio.

Todas as amostras foram colhidas após a capsulorrexe, durante o transoperatório da FACO, que foi realizada com ou sem a utilização do azul de tripano a 0,1%.

4.1 CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS

Com o intuito de avaliar, primeiramente, as alterações ocasionadas pela diabetes e/ou catarata diabética nas amostras estudadas, dividiu-se os animais em 2 grandes grupos:

- GRUPO CATARATA (GC) - grupo dos animais que apresentaram catarata do tipo hipermadura;
- GRUPO CATARATA DIABÉTICA (GCD) - grupo dos animais com catarata intumescente e secundária a diabetes.

Depois, objetivando-se avaliar as alterações ocasionadas pelo azul de tripano a 0,1 % no epitélio lenticular nos 2 grupos, os animais foram subdivididos em 4 diferentes grupos:

- GRUPO AZUL NÃO DIABÉTICOS (GAND) – cápsulas anteriores e o epitélio das lentes de olhos de cães com catarata hipermadura, submetidos à FACO com o uso do azul de tripano;
- GRUPO AZUL DIABÉTICOS (GAD) - cápsulas anteriores e o epitélio das lentes de olhos de cães diabéticos com catarata intumescente, submetidos à FACO com o uso do azul de tripano;
- GRUPO NÃO DIABÉTICOS (GND) - cápsulas anteriores e o epitélio das lentes de olhos de cães com catarata hipermadura, submetidos à FACO sem o uso do azul de tripano;
- GRUPO DIABÉTICOS (GD) - cápsulas anteriores e o epitélio das lentes de olhos de cães diabéticos com catarata intumescente, submetidos à FACO sem o uso do azul de tripano.

4.2 PRÉ-OPERATÓRIO

4.2.1 Exames

Todos os animais submetidos à FACO passaram anteriormente por exame oftálmico completo, incluindo o teste de Schirmer (Teste de Schirmer®, Ophthalmos Ind. Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil), fluoresceína (Colírio de Fluoresceína 1%®, Ophthalmos Ind. Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil), tonometria de aplanção (Tono-Pen®, Bio-Rad, San Jose, CA, EUA), eletrorretinograma (utilizando-se eletrodos do tipo Burian Allen®, sistema eletrodiagnóstico Veris®,

cúpula estimuladora de Ganzfeld; e realizado segundo o protocolo da ISCEV - International Society for Clinical Electrophysiology of Vision) e ultrassom ocular (Accutome®, utilizando-se de sonda de 12 megahertz - MHz).

Hemograma completo, função renal e função hepática, além do exame para avaliação da frutossamina em alguns cães diabéticos, também foram realizados. Eletrocardiograma e/ou ecodopplercardiograma completaram o grupo de exames solicitados.

4.2.2 Medicações

As medicações pré-operatórias incluíram colírios antibióticos e antiinflamatórios, esteroidais nos não diabéticos (Zypred® - gatifloxacino 0,3% com acetato de prednisolona 1% - Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda., Taboão da Serra, SP, Brasil ou Vigadexa® - cloridrato de moxifloxacino 0,5% com fosfato de dexametasona 0,1% - Alcon Labs. do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e colírios antibióticos (Zymar® - gatifloxacino 0,3% - Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda., Taboão da Serra, SP, Brasil ou Vigamox® - cloridrato de moxifloxacino 0,5% - Alcon Labs. do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e antiinflamatórios não esteroidais (Cetrolac® - ceterolaco de trometamina 5mg/ml – Genon Oftalmologia, União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, SP, Brasil) nos animais diabéticos, todos iniciados 3 dias antes da cirurgia. Colírio de Atropina 1%® (Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda., Taboão da Serra, SP, Brasil), foi administrado 1 dia antes da cirurgia.

Nos animais não diabéticos, foi prescrito 1,0 miligrama por quilo por dia (mg/kg/dia) de Meticorten® (Predinisona, Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), iniciado 3 dias antes da cirurgia e por aproximadamente 30 dias após e, para os diabéticos, 0,1 mg/kg/dia de Maxicam® (Meloxicam, Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil), iniciando apenas após a cirurgia por pelo menos 15 dias.

4.2.3 Demais recomendações

Recomendou-se jejum hídrico de 2 horas e alimentar de 8 horas no dia da cirurgia, além da realização de banho e tosa da cabeça e orelhas quando necessário.

4.3 FACECTOMIA EXTRACAPSULAR POR FACOEMULSIFICAÇÃO (FACO)

4.3.1 Anestesia

A anestesia incluiu o uso da injeção intramuscular de 0,5 miligramas por quilo (mg/kg) de Apromazin 0,2%® (Maleato de Acepromazina 0,2%, Syntec, Hortolândia, SP, Brasil) e 2 mg/kg de Dolosal® (Cloridrato de Petidina, Cristália, Itapira, SP, Brasil) como pré-anestésicos. Para a indução, utilizou-se 4 mg/kg de Propovan® (Propofol, Cristália, Itapira, SP, Brasil) intravenoso e a manutenção foi realizada na forma inalatória com Isoforine® (Isoflurano, Cristália, Itapira, SP, Brasil).

4.3.2 Cirurgia

Todas as cirurgias deste estudo foram realizadas pelo mesmo cirurgião (A. M. V. S.).

Após posicionar o paciente em decúbito lateral sob o microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcellos, São Paulo, SP, Brasil ou Opto, São Paulo, SP, Brasil), realizou-se a cantotomia temporal para melhor exposição do olho, se necessário. Incisão na região do limbo superior foi realizada na extensão de aproximadamente 2,8 mm. Nos grupos onde se utilizou o corante, foram aplicadas 10 unidades de azul de tripano (Azul de Trypan 0,1%®, Ophthalmos Ind. Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil) em

20 unidades de ar na câmara anterior, onde permaneceu durante 1 minuto. Uma incisão acessória (*side port*) foi realizada para a entrada do *chopper*.

A cápsula anterior foi removida pela técnica de capsulorrexe circular contínua (CCC). Hidrodissecção foi realizada entre a cápsula e o córtex lenticular com ringer lactato ou solução salina balanceada (BSS®, Ophthalmos Ind. Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil).

Metilcelulose 2%® (Ophthalmos Ind. Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil) foi então aplicada na câmara anterior. Facoemulsificação foi realizada utilizando-se o aparelho Laureate® (Alcon®, Fort Worth, TX, EUA). Material cortical residual da lente foi removido com uma dupla via de irrigação/aspiração (I/A) com BSS®. Após, realizou-se a ceratorrafia com pontos simples isolados (com fio de nylon 8-0) e a cantorráfia (com fio de seda 4-0 ou nylon 5-0).

4.3.3 Pós-operatório

Recomendou-se o uso do colar protetor, correta administração das medicações e repouso. Colírio Trusopt 2%® (Cloridrato de dorzolamida 2%, Merck Sharp & Dohme, Barueri, SP, Brasil) e Mydriacyl® (Tropicamida 1%, Alcon Labs. do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), foram acrescentados ao tratamento tópico, além do uso de antibióticos e antiinflamatórios. Por via oral, também foi incluída a administração de antibiótico sistêmico, por 10 a 15 dias (Baytril® - enrofloxacina, 5 mg/kg/cada 12 horas - Bayer Pet, São Paulo, SP, Brasil ou aplicação de Convênia® - cefovecina sódica, 0,1 ml/kg - Pfizer Animal Health, Conshohocken, PA, EUA).

4.3.4 Amostras

As amostras foram imediatamente fixadas, após a capsulorrexe, em formaldeído 10% e enviadas para laboratórios especializados (Laboratório Pró-biópsia de Histologia Aplicada, São Paulo, SP, Brasil e/ou Laboratório de Neurodegeneração e Reparo do Programa de Pesquisa em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ). As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, clarificadas em xilol e então incluídas em parafina. Secções transversais de 5 µm de espessura, foram obtidas e colocadas em lâminas preparadas com poli-L-lisina para posterior realização das colorações de rotina (HE), das técnicas histoquímicas (PAS e *picrosirius red*) e de imunofluorescências (Beclina – 1 e Caspase - 3).

As lâminas que foram coradas em HE e PAS, em laboratório especializado (Laboratório Pró-biópsia de Histologia Aplicada, São Paulo, SP, Brasil), foram depois encaminhadas ao Laboratório de Oncologia Experimental e Comparadas, da FMVZ-USP, para serem fotomicrografadas.

As lâminas para as técnicas de *picrosirius red* e de imunofluorescências foram enviadas ao Laboratório de Neurodegeneração e Reparo, do Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) do Centro de Ciências e Saúde, da UFRJ, para realização das técnicas de análise e posterior obtenção das fotomicrografias. Controles negativos e positivos para as reações de imunofluorescência também foram preparados.

4.3.5 Técnicas de análises

As amostras foram, primeiramente, desparafinizadas e hidratadas em soluções decrescentes de álcool. Logo após, foram banhadas em água destilada para receberem os corantes específicos para cada avaliação.

4.3.5.1 Coloração de rotina por HE

As lâminas foram coradas em hematoxilina por 5 min e lavadas em água corrente por 10 min. Depois, foram coradas em eosina por 5 min e novamente lavadas em água. Desidratação foi rapidamente realizada com álcool 70%. Diafanização e montagem com bálsamo do Canadá, finalizaram todo o processo.

4.3.5.2 Análises histoquímicas

4.3.5.2.1 PAS

As lâminas foram em ácido periódico a 0,5% por 15 min. Foram lavadas em água destilada por 5 min e imersas em reagente de Schiff por 30 min. Depois, lavagem em água corrente foi realizada por 5 min. Para finalizar, realizou-se a imersão das amostras em hematoxilina por 25 segundos, removendo-se o excesso do corante com água destilada. Desidratação, diafanização e montagem com resina finalizaram o processo.

4.3.5.2.2 *Picrosirius Red*

As lâminas estudadas foram colocadas em solução de ácido fosfomolibdico por 1 min e coradas durante 90 min em solução de picrosirius (Sirius Red F 3B 200, Mobay Chemical Co. Union, NJ, EUA). Foram lavadas com ácido clorídrico 0,01 normais (N) por 2 min e então lavadas em álcool 70% por 45 segundos. Os cortes foram desidratados em soluções crescentes de álcool e clarificados com xileno por 5 min e montadas com bálsamo do Canadá.

4.3.5.3 Análises por Imunofluorescências

As lâminas foram primeiramente desparafinizadas em estufa a 56°C por 10 min e banhadas 3 vezes em xilol por 5 min. Logo em seguida, foram hidratadas em dois banhos de etanol 100% por 10 min cada e dois banhos de etanol a 95% por 10 min. Depois, foram mergulhadas duas vezes em água destilada por 5 min e colocadas numa solução de citrato de sódio 10 ml com pH 6,0 (solução tampão). As lâminas, ainda imersas em tampão citrato de sódio, foram levadas ao forno microondas por 2 min com potência 10 para recuperação antigênica. Em seguida, foram resfriadas em temperatura ambiente e lavadas com PBS (solução salina tamponada).

Realizou-se então o bloqueio antigênico não específico com solução de albumina bovina a 5% em PBS/triton por 60 min. Logo após, anticorpos primários específicos para cada objeto de interesse avaliado (Quadro 1) foram aplicados sobre as lâminas, que foram deixadas em uma câmara úmida com cerca de 4°C durante a noite. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS por 5 min e submetidas ao anticorpo secundário em PBS/triton por 2 h no escuro e em temperatura ambiente. Após, as lâminas foram lavadas em PBS por três vezes durante 5 min cada. Incubação com DAPI foi depois realizada por 5 min em câmara úmida. Lavagem com água destilada foi então realizada para finalmente realizar-se a montagem das lâminas com fluoromount (Fluoromount® Aqueous Mounting Medium, Sigma – Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA).

Quadro 1 - Anticorpos utilizados para as diferentes análises de imunofluorescência

Avaliação	Anticorpo primário	Diluição	Anticorpo secundário	Diluição
Autofagia	<i>Rabbit anti-beclin – 1 polyclonal antibody*</i>	1: 100	Alexa 488 – Goat α -Rabbit***	1:600
Apoptose	<i>Rabbit polyclonal to active Caspase**</i>	1: 300	Alexa 488 – Goat α -Rabbit***	1:600

*Millipore (Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, EUA).

**Abcam (Abcam®, Cambridge, MA, EUA).

***Invitrogen (Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

4.3.6 Captura de imagens

As lâminas preparadas com HE e PAS foram fotomicrografadas utilizando-se de programa específico para captura de imagens (Image-pro plus, Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, EUA), sob microscópio óptico com aumento de 10 vezes, (Nikon Eclipse E 800, Nikon, EUA com câmera fotográfica Nikon FDX-35 acoplada ao sistema).

As lâminas imunoreagidas com Caspase – 3, Beclina - 1 e as coradas com *picrosirius red*, foram inicialmente fotomicrografadas sob microscópio convencional de fluorescência (Zeiss Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Baltimore, Maryland, EUA). Depois, foram observadas sob um microscópio de varredura por laser (LSM) (Zeiss META 510, Carl Zeiss, Baltimore, Maryland, EUA), a 543 nanômetros (nm) de comprimento de onda de excitação para o fluorocromo. As imagens foram adquiridas com resolução de 512 × 512 pixels, com 75% de transmitância a laser, cortes ópticos de 0,7 milimols (mM) de profundidade e 1 min de tempo de varredura no mesmo valor do ganho do detector.

Todas as fotomicrografias foram utilizadas para a realização das mensurações e análises estatísticas comparativas das alterações morfométricas, estruturais e degenerativas da cápsula anterior e epitélio lenticular.

4.3.7 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). A comparação entre os 2 grandes grupos (GC e GCD) e os 4 outros (GAND, GND, GAD e GD), foram realizadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, nas seguintes variáveis:

- Avaliação da comparação do tempo de catarata nos diferentes grupos;
- Avaliação morfológica da cápsula anterior e de seu epitélio (espessura mínima), além do cálculo da porcentagem de epitélio existente nas amostras;
- Avaliação histoquímica e por imunofluorescência para o reconhecimento de intensidade de marcações/colorações, mensuradas por densidade óptica.

Todas as imagens capturadas foram armazenadas em 8-bits, o que permitiu a padronização da escala de semitons de 0 a 255 (escala de densidade óptica - DO), sendo o "0", o valor estabelecido para a ausência de pigmentos (preto).

As variáveis também foram descritivamente analisadas em relação ao valor mínimo de 95% de intervalo de confiança ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Para melhor entendimento das diversas variáveis analisadas, os resultados foram divididos segundo os tópicos abaixo:

5.1 AMOSTRAS

As amostras foram colhidas de 27 cães, com média de idade de 9,6 anos (8 a 12 anos); de diferentes raças, incluindo 7 Poodles, 7 Sem Raça Definida, 2 Labradores, 2 Malteses, 2 Schnauzers, 1 Teckel, 1 Beagle, 1 Border Collie, 1 Fox Terrier, 1 Pointer, 1 West Highland White Terrier e 1 Yorkshire.

Os diabéticos do grupo GCD, incluíram 15 animais (12 fêmeas e 3 machos), apresentando o diagnóstico da diabetes de 1 até 24 meses (média de 8,2 meses) e catarata intumescente, súbita e bilateral com 1 a 10 meses de evolução (média de 4,7 meses) até o dia da colheita da amostra. Os não diabéticos, mas que apresentavam catarata do tipo hipermadura (GC), incluíram 12 animais (9 fêmeas e 3 machos), com histórico de catarata diagnosticada de 4 a 26 meses de evolução (média de 14,6 meses). A diferença entre o tempo de catarata nos 2 grupos foi estatisticamente significativa ($p = 0,0001$) e esta apresentada na figura 5.

Figura 5 - Representação gráfica da diferença entre o tempo de catarata apresentado pelos cães estudados nos grupos GC e GCD. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,0001$).

A divisão específica dos animais estudados segundo os grupos em que foram incluídos, nas variáveis: sexo, idade, tempo de catarata e de diabetes está apresentado na tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos animais segundo sexo, idade, tempo de catarata e de diabetes nos grupos GC e GCD

Grupos	Quantidade de animais por grupo			Alteração até o dia da FACO		
	Cães	Fêmeas	Machos	Idade* (anos)	Catarata* (meses)	Diabete Melito* (meses)
GC	15	12	3	9,6	14,6	-
GCD	12	9	3	9,6	4,7	8,2

*valores médios

Os cães diabéticos apresentaram apenas catarata intumescente e bilateral. Já os animais que formaram o grupo GC, apresentaram catarata hipermadura no olho estudado, mas no olho contralateral, apresentaram diferentes tipos de alteração na lente, tais como: nenhuma alteração (n=4), catarata incipiente (n=2), catarata imatura (n=3), catarata madura (n=2) e catarata hipermadura (n=1).

Não foi observada nenhuma alteração importante nos exames solicitados durante os procedimentos pré-cirúrgicos que contraindicassem as cirurgias. Entretanto, 9 dos 15 cães diabéticos que foram submetidos ao exame de quantificação da frutamina, apresentaram valores que variaram de 385 a 844 milimols por litro ($\mu\text{mol/L}$), sendo que quatro destes apresentaram valores acima dos 500 $\mu\text{mol/L}$ desejado (média de 676,5 $\mu\text{mol/L}$). O ultrassom ocular também mostrou discreta alteração em 5 cães não diabéticos, tais como a presença de membranas vítreas móveis (n=4) e de hialose asteróide (n=1).

Também não foi observada nenhuma complicação no transoperatório das cirurgias deste estudo até o momento da colheita das amostras. Quanto aos olhos operados, 14 eram olhos direitos e 13 esquerdos. A distribuição das amostras colhidas segundo as técnicas de análises realizadas está apresentada na tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição das amostras segundo as análises realizadas

Grupos	Subgrupos	Testes histoquímicos			Testes por Imunofluorescência	
		HE	PAS	PSR	Caspase - 3	Beclina - 1
GC	GND	15	15	5	5	5
	GAND				5	5
GCD	GD	12	12	5	5	5
	GAD				5	5

Nota: HE = Hematoxilina e eosina, PSR = Picrosirius Red, PAS= ácido periódico de Schiff.

5.2 ANÁLISES DE ROTINA E HISTOQUÍMICAS

5.2.1 HE

A coloração em HE evidenciou os componentes estruturais das amostras e possibilitou sua posterior avaliação morfométrica quanto à espessura mínima de epitélio e da cápsula e a quantidade mínima relativa de epitélio (Figuras 6 A e 6 B):

Figura 6 – Fotomicrografias obtidas de duas amostras coradas em HE, em um cão SRD com 10 anos de idade, do grupo GC (A) e em um cão da raça Lhasa Apso de 9 anos do GCD (B). Observa-se a cápsula (estrela), o núcleo de uma célula epitelial (seta preta fina), a face lenticular (seta branca com borda preta) e humoral da cápsula (seta preta grossa)

Fonte: Serviço de Oftalmologia – HOVET – USP.

5.2.1.1 Variedades de epitélio

Observou-se uma variedade importante entre os padrões de epitélio lenticular nas imagens obtidas. Diferente da esperada monocamada normal de epitélio aderida à cápsula (Figura 7), observou-se diferentes apresentações de epitélio, muitas vezes dentro do mesmo grupo estudado (Figuras 8 A, B, C e D).

Figura 7 - Fotomicrografia obtida de um cão normal, de 12 anos de idade, *post mortem*. Observa-se a monocamada de células epiteliais (seta preta fina), aderidas à cápsula (estrela)

Fonte: Serviço de Oftalmologia – HOVET – USP.

Figura 8 - Fotomicrografias obtidas de quatro amostras diferentes coradas em HE do grupo GCD, em um Schnauzer, fêmea, com 8 anos de idade, 5 meses de catarata e 7 meses de diabetes (A); em um Beagle, fêmea, de 8 anos de idade, com 2 meses de catarata e 2 meses de diabetes (B); em um Poodle, fêmea, de 9 anos de idade, com 10 meses de catarata e 10 meses de diabetes (C); e em um Labrador, macho, de 8 anos de idade, com 8 meses de catarata e 8 meses de diabetes (D). Observa-se em (A), a monocamada de epitélio presente, mas descolada da cápsula (estrela); em (B), o epitélio presente, aderido à cápsula, mas duplicado (seta preta fina mostra a presença de 2 núcleos); em (C), o epitélio mesclado à cápsula anterior, que se apresenta degenerada (seta branca com borda preta); em (D), o epitélio metaplásico, espessado, com diversas camadas de células (seta preta grossa)

Fonte: Serviço de Oftalmologia – HOVET – USP.

5.2.1.2 Análises morfológicas das amostras coradas em HE

Realizou-se a análise estatística de Mann-Whitney para a avaliação das seguintes variáveis: espessura mínima do epitélio, da cápsula e quantidade relativa de epitélio.

5.2.1.2.1 Espessura mínima do epitélio

Observou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre as amostras dos grupos GC e GCD (Tabela 3 e Figura 9).

Tabela 3 - Distribuição dos valores de espessura mínima do epitélio (μm) entre os grupos GC e GCD

	Mínima	Mediana	Máxima	Erro Padrão	P<0,05
GC	4,76	10,65	30,73	2,22	P = 0,3072
GCD	5,79	17,18	54,89	4,79	

Figura 9 - Representação gráfica da análise da espessura mínima de epitélio entre os grupos GCD e GC

5.2.1.2.2 Espessura mínima da cápsula

Observou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre as amostras dos grupos GC e GCD (Tabela 4 e Figura 10).

Tabela 4 - Distribuição dos valores de espessura mínima da cápsula (μm) entre os grupos GC e GCD

	Mínima	Mediana	Máxima	Erro Padrão	P<0,05
GC	62,61	88,65	136,7	7,63	P = 0,2970
GCD	80,62	103,9	139,6	5,08	

Figura 10 - Representação gráfica da análise da espessura mínima da cápsula entre os grupos GCD e GC

5.2.1.2.3 Relação epitélio/cápsula – Espessura relativa mínima

Observou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre as amostras dos grupos GC e GCD (Tabela 5 e Figura 11).

Tabela 5 - Distribuição dos valores de relação epitélio/cápsula ($\mu\text{m}/\mu\text{m}$) entre os grupos GC e GCD

	Mínima	Mediana	Máxima	Erro Padrão	P<0,05
GC	0,05	0,12	0,28	0,02	P = 0,5558
GCD	0,05	0,18	0,45	0,04	

Figura 11 - Representação gráfica da análise da espessura relativa mínima de epitélio (Espessura mínima do epitélio / Espessura mínima da cápsula) entre os grupos GCD e GC

5.2.2 PAS

A coloração em PAS evidenciou a presença dos proteoglicanos nas amostras e possibilitou sua posterior quantificação de densidade óptica dentre os diferentes grupos (Figuras 12 A e B):

Figura 12 - Fotomicrografias das amostras submetidas à técnica de PAS em um cão da raça West Highland White Terrier de 10 anos do GC (A) e um cão da raça Maltes de 11 anos do GCD (B). Observa-se a cápsula (estrela) corada na cor magenta (PAS) evidenciando os proteoglicanos

Fonte: Serviço de Oftalmologia – HOVET – USP.

5.2.2.1 Quantificação da intensidade de PAS nos diferentes grupos

Observou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre as amostras dos grupos GC e GCD (Tabela 6 e Figura 13).

Tabela 6 - Distribuição dos valores de densidade óptica quanto a coloração de PAS entre os grupos GC e GCD

	Mínima	Mediana	Máxima	Erro Padrão	P<0,05
GC	96,95	129,4	169,3	8,11	P = 0,2176
GCD	116,5	144,8	168,4	6,21	

Figura 13 - Representação gráfica da análise da densidade óptica da técnica de PAS corado entre os grupos GC e GCD

5.2.3 *Picrosirius Red*

A coloração em *picrosirius red* evidenciou a presença de colágeno IV nas amostras e possibilitou sua posterior quantificação da densidade óptica dentre os diferentes grupos (Figuras 14 A e B):

Figura 14 - Fotomicrografias obtidas das amostras submetidas ao PSR em um cão da raça Maltes de 11 anos do GC (B) e um cão da raça West Highland White Terrier de 10 anos do GCD (A). Observa-se a cápsula corada na cor vermelha (PSR) evidenciando o colágeno IV

Fonte: Serviço de Oftalmologia – HOVET – USP.

5.2.3.1 Quantificação da intensidade de *picrosirius red* nos diferentes grupos

Observou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre as amostras dos grupos GC e GCD (Tabela 7 e Figura 15).

Tabela 7 - Distribuição dos valores de densidade óptica quanto a coloração de PSR entre os grupos GC e GCD

	Mínima	Mediana	Máxima	Erro Padrão	P<0,05
GC	47,13	61,25	92,16	5,93	P = 0,1728
GCD	10,74	45,05	87,33	8,74	

Figura 15 - Representação gráfica da análise da densidade óptica da técnica de PSR corado entre os grupos GC e GCD

5.3 ANÁLISES POR IMUNOFLUORESCÊNCIAS

5.3.1 Caspase – 3

Foi observada, pela análise da expressão de Caspase-3, positividade para morte celular por apoptose (Figura 16 A, B, C e D) em todos os grupos estudados:

Figura 16 - Fotomicrografias obtidas das amostras dos quatro grupos estudados, marcadas com Caspase – 3. Observar a positividade da expressão de morte celular por apoptose nas células do epitélio lenticular marcadas em verde fluorescente (seta branca) em: (A) Maltês, fêmea de 10 anos do GND; (B) SRD, fêmea, de 12 anos, do GAND; (C); Border Collie, fêmea, de 11 anos, do GD e (D); SRD, fêmea, de 12 anos, do GAD. Observa-se também a cápsula das amostras (estrela branca)

Fonte: Serviço de Oftalmologia – HOVET – USP.

5.3.1.1 Quantificação da intensidade de marcação de Caspase-3 nos diferentes grupos

A intensidade de Caspase-3 apresentada na tabela 8 e figura 17 dos epitélios avaliados, demonstra que houve apoptose em todos os grupos estudados, que esta marcação não foi diferente entre os grupos e foi independente da utilização de azul de tripano a 0,1%, não mostrando nenhuma diferença estatisticamente significativa quando realizada as comparações entre eles.

Tabela 8 - Distribuição dos valores mensurados de Caspase-3 marcada no epitélio lenticular das amostras, submetidas ou não ao azul de tripano a 0,1%, nos diferentes grupos

	Mínima	Mediana	Máxima	Erro Padrão	P<0,05
GND	0,33	0,48	0,60	0,04	P = 0,3095
GAND	0,32	0,38	0,56	0,04	
GD	0,38	0,47	0,65	0,04	P = 0,8958
GAD	0,39	0,52	0,58	0,04	

Figura 17 - Representação gráfica da mensuração de intensidade de Caspase-3 nos diferentes grupos

Realizou-se um segundo teste estatístico, comparando a intensidade de Caspase-3, agora nos grupos GD e GND, sem a presença do azul de tripano. Os valores obtidos estão apresentados na tabela 9, e demonstram que houve igual intensidade de expressão de Caspase - 3 em ambos os grupos estudados ($P = 1,0$).

Tabela 9 - Distribuição dos valores mensurados de Caspase-3 marcada no epitélio lenticular dos 2 grandes grupos (GND e GD)

	Mínima	Mediana	Máxima	Erro Padrão	P<0,05
GND	0,33	0,48	0,60	0,04	P = 1,0
GD	0,38	0,47	0,65	0,04	

5.3.2 Beclina – 1

Foi observada, pela análise da expressão de Beclina-1, positividade para morte celular por autofagia (Figura 18 A, B, C e D) em todos os grupos estudados:

Figura 18 - Fotomicrografias obtidas das amostras dos quatro grupos estudados, marcadas com Beclina – 1. Observar a positividade da expressão de morte celular por autofagia no citoplasma das células do epitélio lenticular marcadas em verde fluorescente (seta branca) em: (A) Poodle, fêmea, de 8 anos do GND; (B) Yorkshire, fêmea, de 10 anos, do GAND; (C); Teckel, fêmea, de 12 anos, do GD e (D) Beagle, fêmea, de 8 anos, do GAD. Observam-se também as cápsulas das amostras (estrela branca)

Fonte: Serviço de Oftalmologia – HOVET – USP.

5.3.2.1 Quantificação da intensidade de marcação de Beclina - 1 nos diferentes grupos

A intensidade de Beclina - 1 apresentada na tabela 10 e figura 19 dos epitélios avaliados, demonstra que houve autofagia em todos os grupos estudados, que esta marcação não foi diferente entre os grupos e independente da administração de azul de tripano a 0,1 %, não mostrando nenhuma diferença estatisticamente significativa quando realizada as comparações entre eles.

Tabela 10 - Distribuição dos valores mensurados de Beclina - 1 marcada no epitélio lenticular das amostras, submetidas ou não ao azul de tripano a 0,1%, nos diferentes grupos

	Mínima	Mediana	Máxima	Erro Padrão	P<0,05
GND	9,12	32,82	57,25	8,89	P = 0,3095
GAND	10,59	11,28	51,24	8,84	
GD	17	18,04	25,65	2,03	P = 0,9812
GAD	3,61	16,60	35,22	5,61	

Figura 19 - Representação gráfica da mensuração de intensidade de Beclina - 1 nos diferentes grupos

Realizou-se um segundo teste estatístico, comparando a intensidade de Beclina – 1, agora nos grupos GD e GND, sem a presença do azul de tripano. Os valores obtidos estão apresentados na tabela 11, e demonstram que houve igual intensidade de expressão de Beclina - 1 em ambos os grupos estudados ($P = 0,9682$).

Tabela 11 - Distribuição dos valores mensurados de Beclina - 1 marcada no epitélio lenticular dos 2 grandes grupos (GND e GD)

	Mínima	Mediana	Máxima	Erro Padrão	P<0,05
GND	9,12	32,82	57,25	8,89	P = 0,9682
GD	17	18,04	25,65	2,03	

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Dois tipos de cataratas com fisiopatologias completamente diferentes, mas consideradas graves e de alto risco, foram estudadas: a catarata diabética, de evolução rápida, bilateral e do tipo intumesciente (BEAM; CORREA; DAVIDSON, 1999; SAFATLE et al., 2000; SLATTER, 2005), e a catarata hipermadura, de evolução lenta, progressiva e crônica (tardia) (SLATTER, 2005; OFRI, 2008; VENKATESH et al., 2010). Neste estudo, as cataratas hipermaduras apresentaram, do dia do diagnóstico de catarata (independente da fase), até o dia da cirurgia (já hipermadura), tempo de evolução 3 vezes maior do que as diagnosticadas nos animais diabéticos (14,6 meses nas hipermaduras, contra 4,7 meses nas diabéticas), sendo esta diferença estatisticamente significativa. Das 15 cataratas diabéticas estudadas, observou-se que 7 foram diagnosticadas no mesmo dia da consulta em que se diagnosticou a diabetes em si, mostrando a rápida evolução da alteração na lente (BEAM; CORREA; DAVIDSON, 1999; SAFATLE et al., 2000; SLATTER, 2005), antes mesmo da percepção dos proprietários às alterações clínicas da doença (sistêmicas), tal como o ganho de peso, a poliúria e a polidipsia (BASHER; ROBERTS, 1995; SLATTER, 2005).

Os resultados das análises realizadas neste estudo demonstram que a agressividade do metabolismo que ocorre na lente durante a diabetes, é capaz de ocasionar lesões tão importantes quanto à cronicidade de uma catarata hipermadura. Além disso, observou-se que o grau de alterações das células do epitélio lenticular foi tal, que a presença ou não de azul de tripano a 0,1 %, já comprovadamente tóxico para estas células (PORTES et al., 2007; PORTES et al., 2010), provavelmente foi capaz de promover toxicidade nos grupos em que foi testado, porém, as células já expressavam as moléculas sinalizadoras de morte celular por apoptose e autofagia, antes mesmo da sua utilização.

Este estudo foi realizado nos cães atendidos na rotina do Hospital Veterinário (HOVET) da FMVZ-USP, onde se observa o freqüente diagnóstico destes tipos de cataratas e, por conseqüência, a alta demanda das cirurgias. A realização da técnica cirúrgica de FACO em cataratas hipermaduras não são as melhores intervenções para o cirurgião oftalmologista, pois a lente pode apresentar alterações significativas

em sua estrutura capazes de comprometer o sucesso cirúrgico (DAVIDSON et al., 1990). Venkatesh et al. (2010) observaram que a FACO em cataratas hiper maduras também são frequentemente realizadas em pacientes humanos atendidos na Índia, um país em desenvolvimento como o Brasil. Corroborando com Khanna, Pujari; Sangwan (2011), acreditamos que a justificativa de tal ocorrência, tanto pelos proprietários dos cães, quanto pelos pacientes humanos, seja o alto custo da cirurgia e a falta de profissionais habilitados nestes países.

As alterações estruturais ocasionadas na lente por ambos os processos de formação destes tipos de cataratas e a uveíte facoinduzida, inflamação intraocular que pode ocorrer em qualquer momento durante seu curso de evolução, poderiam deixar seqüelas importantes na morfologia, composição molecular (BASHER; ROBERTS, 1995; LEASURE; GELATT; MACKAY, 2001; GELATT, 2003; SLATTER, 2005) e, principalmente, na expressão de morte celular do epitélio lenticular, onde ocorre a maior parte do seu metabolismo (BASHER; ROBERTS, 1995; SLATTER, 2005; YAN et al., 2005; KUMAMOTO et al., 2007).

A escolha de cães idosos (média = 9,6 anos) e diabéticos, que são mais susceptíveis a apresentarem doenças oftálmicas (LEASURE; GELATT; MACKAY, 2001) e sistêmicas (BASHER; ROBERTS, 1995; LANDRY; HERRING; PANCIERA, 2004; SLATTER, 2005), poderiam também comprometer as amostras. Por conta disto, a realização do exame clínico e oftálmico completo antes da cirurgia, como sugerido por diversos autores (BASHER; ROBERTS, 1995; GELATT, 2003), permitiu com que a maioria das amostras estudadas fosse livre de quaisquer alterações importantes (que não a diabetes e a catarata), desde o dia do primeiro atendimento, até o dia da cirurgia, sendo este o principal critério de exclusão estabelecido. Tal critério acabou por limitar de maneira importante o número de animais recrutados para o estudo mas, por outro lado, os incluídos certamente garantiram a confiabilidade necessária para sua conclusão.

As principais alterações observadas durante o processo de recrutamento dos animais, foram a variação na quantificação da frutossamina e a presença de hialose asteróide e membranas vítreas no exame de ultrassom ocular. Quatro dos nove cães diabéticos testados, apresentaram valores médios de 676,5 $\mu\text{mol/L}$ de frutossamina (normal até 500 $\mu\text{mol/L}$), o que sugere a falta de controle glicêmico adequado da diabetes (TILLEY; SMITH Jr., 2003) antes da cirurgia. Corroborando com

os autores que concordam que a demora para se realizar o tratamento cirúrgico das cataratas diabéticas pode predispor à uveíte e posterior glaucoma (DZIEZYC, 1990; BASHER; ROBERTS, 1995; SLATTER, 2005), decidiu-se realizar o procedimento após a avaliação dos demais exames de sangue, cardíacos e oftálmicos. Apesar de Kim et al. (2012) terem observado que, quanto maior os valores da frutossamina, maior será a taxa de apoptose nas células do epitélio lenticular, observamos que as amostras dos grupos GD e GAD apresentaram positividade quanto à expressão de Caspase-3 semelhantes entre si, independente da glicemia avaliada.

Neste estudo, observamos que dos 27 cães estudados, 4 (14,8 %) apresentaram membranas vítreas móveis e apenas 1 hialose asteróide (3,7 %) pelo exame de ultrassom ocular, todos pertencentes ao GC. A presença destas alterações já havia sido observada por Quinze et al. (2004), que diagnosticaram 81% dos olhos apresentando membranas vítreas em diferentes quantidades e 3% deles com hialose asteróide, sendo também estas alterações mais frequentemente observadas nos exames realizados em cães com cataratas hipermaduras.

Corroborando com estudos anteriormente realizados, observamos bastante dificuldade em trabalhar com o material escolhido, pois além das amostras serem muito pequenas, finas e, quando não coradas com o azul de tripano, também transparentes (BASHER; ROBERTS, 1995; GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; SLATTER, 2005), o epitélio pode se apresentar com significativa variedade de padrões à microscopia (BERNAYS; PEIFFER, 2000; COLITZ et al., 2000), o que também foi observado neste estudo e dificultou, de certa forma, a realização das análises morfológicas e estatísticas.

Apesar dos diversos tipos de epitélios observados, as amostras dos diferentes grupos apresentaram-se morfolologicamente semelhantes entre si, não apresentando diferença estatisticamente significativa quanto à espessura da cápsula e do epitélio. A espessura da cápsula varia de acordo com a presença de doenças e com o avançar da idade (KRAG; ANDREASSEN, 2003; BARROS et al., 2008; DANYSH; DUNCAN, 2009). No cão adulto sadio, pode medir de 50 – 70 μm , mas chegar a 137 μm de espessura em um cão com 14 anos de idade (BASHER; ROBERTS, 1995; GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; BERNAYS; PEIFFER, 2000; SLATTER, 2005). Neste estudo, analisamos apenas cães idosos com cataratas importantes. Portanto, corroborando com a literatura, observamos que a espessura das cápsulas

foi maior do que a referida pela literatura, apresentando nos cães com catarata não diabética (GC), mediana de 88,65 μm e, nos diabéticos (GCD), 103,9 μm , chegando até 136,7 μm e 139 μm . Gelatt (2003) refere que, apesar da diabetes, as cápsulas lenticulares tendem a ficar fina pela intumescência da lente no entanto, Barros e et al. observaram que há um aumento da espessura em cães diabéticos quando comparados com os que apresentam cataratas do tipo maduras e hiper maduras., o que também foi observado em nosso estudo, o qual avaliou apenas cataratas do tipo hiper madura e onde não se observou diferença estatisticamente relevante entre os grupos.

A avaliação da quantidade relativa de células do epitélio, ou seja, a relação da espessura do epitélio/espessura da cápsula foi igual entre os grupos, não apresentando diferença estatisticamente significativa, o que demonstra que: apesar das alterações sofridas pela lente em ambos os processos de formação da catarata, o epitélio e sua lâmina basal (cápsula) mantêm a relação anatômica entre si; sugere-se ainda que, como não foi observada diferença entre os grupos, a intensidade das alterações devam ser semelhantes entre as cataratas estudadas. A relação fisiológica direta entre o epitélio e sua lâmina basal (cápsula) já foi descrita em diversos estudos anteriormente realizados e corroboram com os nossos achados (WINKLER et al., 2001; LEBLEU; MACDONALD; KALLURI, 2007; HAFTER et al., 2013).

Observou-se pelas análises histoquímicas (PAS e *picrosirius red*), que além da relação anatômica mantida, há também uma suposta correlação entre a lesão do epitélio e a alteração na composição molecular da cápsula, já que não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão das moléculas de proteoglicanos e colágeno IV entre os grupos. Corroborando com este, diversos estudos também já observaram esta interação fisiológica entre a cápsula (MEC) e o epitélio (células) e sua alteração na presença de doenças (LEBLEU; MACDONALD; KALLURI, 2007; VOET; VOET; PRATT, 2008; DANYSH; DUNCAN, 2009; NELSON; COX, 2011; TIWARI; RAM; LUTHRA-GUPTASARMA, 2014). Estudo realizado em humanos com cataratas corticais e diabéticas por exemplo, observou o aumento na expressão de proteínas na MEC nos pacientes doentes, o que supostamente poderia alterar a composição dos proteoglicanos nessa estrutura e, por consequência, sua função (TIWARI; RAM; LUTHRA-GUPTASARMA, 2014). Outros

estudos referem que a metaplasia do epitélio lenticular na presença de catarata e/ou diabetes, produzem maior quantidade de colágeno e que a alteração é também maior no grupo dos diabéticos (GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; BRAS et al., 2006; POT et al., 2009; WORMSTONE; WANG; LIU, 2009; CHANDLER et al., 2012). Diferente dos estudos referidos, estudou-se as cápsulas provenientes de cataratas diabéticas e hiper maduras (não corticais ou nucleares), onde ambas apresentaram-se com composições moleculares semelhantes, sugerindo que as alterações ocasionadas pelo metabolismo das cataratas, sejam também de similar intensidade.

A expressão de morte celular por apoptose e autofagia nas células do epitélio anterior da lente foi observada em todos os grupos estudados e não dependeu da presença de azul de tripano a 0,1 %. Corroborando com nosso estudo, Mohamad et al. (2013) observaram que a apoptose ocorre na presença de estresse oxidativo decorrente da idade avançada ou na presença de doenças. Estudos anteriormente realizados, também observaram o aumento da expressão de Caspase-3 com o avançar da idade e na presença de catarata cortical e diabética, sendo maior ainda na presença de diabetes e retinopatia diabética (KIM et al., 2012; JUNG et al., 2013; MOHAMAD et al., 2013). Diferente do estudo referido, estudamos apenas catarata completa do tipo hiper madura (crônica e tardia), o que pode justificar a mesma taxa de morte celular entre os animais diabéticos e não diabéticos.

A morte celular por autofagia ocorre onde há lesão celular, como na alteração da expressão de fatores de crescimento (CAO; KLIONSKY, 2007; FROST et al., 2014). Observamos a mesma taxa de morte celular por autofagia entre os grupos estudados, o que sugere que a alteração também seja similar entre eles, apesar da diferente fisiopatologia da doença.

Diferente de Portes et al. (2010), não foi observado diferença estatisticamente significativa quanto à taxa de morte celular por apoptose e autofagia entre os grupos testados com o azul de tripano a 0,1 %. Entretanto, no estudo referido, os autores avaliaram apenas as amostras provenientes de cataratas nucleares e subcapsulares e não de cataratas completas, do tipo hiper madura e diabética, ou seja, dois tipos de cataratas que proporcionam alterações muito mais severas ao metabolismo epitelial da lente e capazes, como observado, de lesionar as células na mesma intensidade, independente da utilização do corante. Sugere-se que, provavelmente, a toxicidade

do azul de tripano foi mascarada pela pelas sinalizações moleculares das fisiopatologias das cataratas estudadas.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a cronicidade da catarata hipermadura e a agressividade da catarata diabética, são capazes de gerar alterações significativas às células epiteliais, que podem refletir diretamente na composição molecular (quantitativa e qualitativa) de sua lâmina basal (cápsula), mas que ainda é capaz de manter sua estrutura morfológica nos diferentes grupos e, na presença ou não de azul de tripano.

Ainda podemos discutir que as alterações celulares observadas neste estudo poderiam, supostamente, serem capazes de diminuir a OCP em cães com catarata diabética e hipermadura (LEBLEU; MACDONALD; KALLURI, 2007; VOET; VOET; PRATT, 2008; DANYSH; DUNCAN, 2009; NELSON; COX, 2011; CHANDLER et al., 2012; JOSHI, 2013), independentemente do uso ou não do azul de tripano, já que as células do epitélio lenticular já estariam comprometidas por processos de morte celular programada decorrentes da evolução dos processos de formação das cataratas, devido à existência de outras causas de formação da opacidade (GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; BRAS et al., 2006; POT et al., 2009; WORMSTONE; WANG; LIU, 2009; JOSHI, 2013; CHANDLER et al., 2012), diversos autores referem que o próprio trauma cirúrgico também induz a uma resposta de cicatrização que promove o aumento da deposição de ME, retração da lamina basal e diferenciação celular para a cápsula posterior, alterações que contribuem para o desenvolvimento da OCP (WORMSTONE, WANG, LIU, 2009).

Podemos sugerir ainda a realização de novos estudos, com diferentes fases de evolução da catarata, para poder-se avaliar a real toxicidade do azul de tripano a 0,1% em cães, além da inclusão de maior número de amostras e a realização de outras formas de análises laboratoriais, para que se possa dar continuidade a essa linha de pesquisa e impedir, prevenir e/ou reduzir o aparecimento da OCP em cães.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. As cataratas diabéticas e hiper maduras mantêm a relação anatômica entre seu epitélio e cápsula, independente da gravidade do metabolismo de seu processo de formação.
2. Ambos os tipos de cataratas apresentam composições moleculares semelhantes de proteoglicanos e colágeno IV em sua cápsula (no aspecto quantitativo), sugerindo que a lesão que acontece nas células do epitélio pela formação das cataratas diabéticas e hiper maduras são similares e acompanhadas, diretamente, por alterações em sua lâmina basal.
3. As amostras dos grupos diabéticos (GD e GAD), apresentaram positividade quanto à expressão de Caspase - 3 e Beclina - 1 semelhantes entre si, independente da glicemia avaliada.
4. Ambos os tipos de cataratas são capazes de induzir alterações no epitélio lenticular, promovendo a morte das células por apoptose e autofagia, observadas pela positividade na expressão de Caspase – 3 e Beclina – 1.
5. O uso de azul de tripano a 0,1 % não foi capaz de determinar as taxas de morte celular no epitélio lenticular de cataratas hiper maduras e diabéticas, já que, as células já se apresentavam neste processo antes de sua utilização.
6. Grupos de animais submetidos ao uso do azul de tripano a 0,1 % durante a FACO, mostraram a expressão de moléculas sinalizadoras de morte celular por apoptose e autofagia por conta dos processos de formação dos tipos cataratas estudadas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- BAGLEY, L. H.; LAVACH, J. D. Comparison of postoperative phacoemulsification results in dogs with and without diabetes mellitus: 153 cases (1991-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 8, p. 1165-69, 1994.
- BAILEY, A. J.; SIMS, T. J.; AVERY, N. C.; MILES, C. A. Chemistry of collagen cross-links: glucose-mediated covalent cross-linking of type-IV collagen in lens capsules. **Biochemistry Journal**, v. 296, p. 489-496, 1993.
- BARROS, L. F. M.; FERNANDES, B.F.; BAKALIAN, S.; SAFATLE, A. M. V.; BARROS, P. S. M.; BURNIER JR., M. N. Anterior lens capsule thickness in diabetic and non-diabetic dogs. **ARVO Meeting Abstracts**, v. 49, p. 2282, 2008.
- BARROS, P. S. M.; ANGELOTTI, A. C.; NOBRE, F.; MORALES, A.; FANTONI, D. T.; BARROS, S. B. M. Antioxidant profile of cataractous English Cocker Spaniels. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, p. 83-86, 1999.
- BARROS, P. S. M.; PADOVANI, C. F.; SILVA, V. V.; QUEIROZ, L. E.; BARROS, S. B. M. Antioxidant status of dog aqueous humor after extracapsular lens extraction. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 1491-1494, 2003.
- BASHER, A. W.; ROBERTS, S. M. Ocular manifestations of diabetes mellitus: diabetic cataracts in dogs. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 25, n. 3, p. 661-676, 1995.
- BATTAGLIA C.; MAYER U.; AUMAILLEY M.; TIMPL R.; Basement membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. **European Journal of Biochemistry**, v. 208, p. 359-366, 1992.
- BEAM, S.; CORREA; M. T.; DAVIDSON, M. G. A retrospective-cohort study on the development of cataracts in dogs with diabetes mellitus: 200 cases. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, n. 3, p. 169-172, 1999.
- BERNAYS M. E.; PEIFFER R. L. Morphologic alterations in the anterior lens capsule of canine eyes with cataracts. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 12, p. 1517-1519, 2000.
- BOUHANNA, L. Surgical treatment of the diabetic cataract: a retrospective study of 47 cases (85 eyes). **Veterinary Ophthalmology**, v. 6, n. 4, p. 343-350, 2003. Trabalho apresentado no Joint Meeting of the British Association of Veterinary Ophthalmologists, European College of Veterinary Ophthalmologists, European Society of Veterinary Ophthalmology, and the International Society of Veterinary Ophthalmology. Cambridge, June 26-29, 2003.

BRAS, D.; COLITZ, C. M. H.; SAVILLE, W. J. A.; GEMENSKY-METZLER, A. J.; WILKIE, D. A. Posterior capsular opacification in diabetic and non diabetic canine patients following cataract surgery. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 5, p. 317-327, 2006.

CAMMARATA, P. R.; CANTU-CROUCH, D.; OAKFORD, L.; MORRIL, A. Macromolecular organization of bovine lens capsule. **Tissue Cell**, v. 18, p. 83-97, 1986.

CAO, Y.; KLIONSKY, D. J.; Physiological functions of Atg6; Beclin 1: a unique autophagy-related protein. **Cell Research**, v. 10, p. 839-849, out 2007.

CHANDLER, H. L.; HAEUSSLER JR, D. J.; GEMENSKY-METZLER, A. J.; WILKIE, D. A.; LUTZ, E. A. Induction of Posterior Capsule Opacification by Hyaluronic Acid in an Ex Vivo Model. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 53, n. 4, p. 1835-1845, 2012.

CHANG, Y. S.; TSENG, S. Y.; TSENG, S. H.; CHEN, Y. T.; HSIAO, J. H. Comparison of dyes for cataract surgery. Part 1: cytotoxicity to corneal endothelial cells in a rabbit model. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 31, n. 4, p. 792-798, 2005.

COLITZ, C. M. H.; MALARKEY D.; DYKSTRA M. J.; McGAHAN M. C., DAVIDSON M. G. Histologic and immunohistochemical characterization of lens capsular plaques in dogs with cataracts. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 2, p. 139-143, 2000.

CORY, S. Regulation of lymphocyte survival by bcl-2 gene family. **Annual Review of Immunology**, v. 13, p. 513-543, 1995.

DANYSH, B. P.; DUNCAN, M. K. The lens capsule. **Experimental Eye Research**, v. 88, n. 2, p. 151-164, 2009.

DAVIDSON, M. G.; NASSISSE, M. P.; RUSNAK, I. M.; CORBETT, W. T.; ENGLISH, R. V. Success Rates of Unilateral vs. Bilateral Cataract Extraction in Dogs. **Veterinary Surgery**, v. 19, n. 3, p. 232-236, 1990.

DAVIDSON, M. G.; NELMS, S. R. Diseases of the canine lens and cataract formation. In: GELATT K.N. (Ed.). **Veterinary ophthalmology**. 4th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2007. p. 859-887.

DICK, H. B.; ALIYEVA, S. E.; HENGERER, F. Effect of trypan blue on the elasticity of the human anterior lens capsule. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 34, p. 1367-1373, 2008.

DZIEZYC, J. Cataract surgery. Current Approaches. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 20, n. 3, p. 737-754, 1990.

FROST, L. S.; MITCHELL, C. H.; BOESZE-BATTAGLIA, K. **Autophagy in the eye: implications for ocular cell health**, v. 124, p. 56-66, 2014.

GELATT, K. N. **Manual de oftalmologia veterinária**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2003. 594 p.

GELATT, K. N.; GELATT, J. P. Surgical procedures of the lens and cataracts. In: _____. **Small animal ophthalmic surgery: a practical guide for the practicing veterinarian**. Gainesville: Elsevier Health Sciences, 2001. p. 299-314,

GLOVER, T. D.; CONSTANTINESCU, G. M. Surgery for cataracts. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 27, n. 5, p. 1143-1173, 1997.

GWIN, R. M.; WARREN, J. K.; SAMUELSON, D. A.; GUM, G. G. Effects of phacoemulsification and extracapsular lens removal on corneal thickness and endothelial cell density in the dog. **Investigative Ophthalmology**, v. 24, p. 227-236, 1983.

HALFTER, W.; CANDIELLO, J.; HU, H.; ZHANG, P.; SCHREIBER, E.; BALASUBRAMANI, M. Protein composition and biomechanical properties of in vivo-derived basement membranes. **Cell Adhesion & Migration**, v. 7, n. 1, p. 64-71, 2013.

HANDLER, M.; YURCHENCO, P. D; LOZZO, R. V. Developmental expression of perlecan during murine embryogenesis. **Developmental Dynamics**, v. 210, n. 2, p. 130-145, 1997.

HONG, S. B.; LEE, K. W.; HANDA, J. T.; JOO, C. K. Effect of advanced glycation end products on lens epithelial cells in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, p. 53-59, 2000.

JOHANSSON, G.; SVINENG, G.; WENNERBERG, A.; ARMULIK, A.; LOHIKANGAS, L. Fibronectin-integrin interactions. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. d126-d146, 1997.

JOHNSON, M. C.; BEEBE, D. C. Growth, synthesis and regional specialization of the embryonic chicken lens capsule. **Experimental Eye Research**, v. 38, p. 579-592, 1984.

JOSHI, R. S. Primary posterior capsular opacification in Indian rural population undergoing cataract surgery for hypermature senile cataract. **Clinical Ophthalmology**, v. 7, p. 1605-1608, 2013.

JUNG, Y.; KIM, M. S.; JOO, C.; CHUNG, S. K. Role of intrinsic apoptotic pathway in cataractogenesis in type 2 diabetic patients. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 39, p. 1470-1476, 2013.

KANSKI, J. J. **Clinical ophthalmology**. A systematic approach. 2. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1989. 491 p.

KEEN, H.; JARRETT, J. **Complications of diabetes**. London: Edward Arnold, 1975. 286 p.

KHANNA, R.; PUJARI, S.; SANGWAN, V. Cataract surgery in developing countries. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 22, n. 1, p. 10-14, 2011.

KIM, B.; KIM, S. Y.; CHUNG, S. K. Changes in apoptosis factors in lens epithelial cells of cataract patients with diabetes mellitus. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 38, p. 1376-1381, Agosto 2012.

KODJIKIAN, L.; RICHTER, T.; HALBERSTADT, M.; BEBY, F.; FLUECKIGER, F.; BOEHNKE, M.; GARWEG, J.G. Toxic effects of indocyanine green, intracyanine green, and trypan blue on the human retinal pigmented epithelium. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 243, n. 9, p. 917-925, 2005.

KRAG, S.; ANDREASSEN, T. T. Mechanical properties of the human posterior lens capsule. **Investigative Ophthalmology Vision Science**, v. 44, p. 691-96, 2003.

KUMAMOTO, Y.; TAKAMURA, Y.; KUBO, E.; TSUZUKI, S.; AKAGI, Y. Epithelial cell density in cataractous lenses of patients with diabetes: Association with erythrocyte aldose reductase. **Experimental Eye Research**, v. 85, p. 393-99, 2007.

LANDEMORE, G.; STEFANI, P.; QUILLEC, M.; LECOQ-GUILBERT, P.; BILLOTE, C.; IZARD, J. Uneven distribution and size of rabbit lens capsule proteoglycans. **Histochemistry Journal**, v. 31, p. 161-167, 1999.

LANDRY, M. P.; HERRING, I. P.; PANCIERA, D. L. Fundoscopic findings following cataract extraction by means of phacoemulsification in diabetic dogs: 52 cases (1993-2003). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 5, p. 709-716, 2004.

LEASURE, J.; GELATT, K. N.; MACKAY, E. O. The relationship of cataract maturity to intraocular pressure in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, n. 4, p. 273-276, 2001.

LEBLEU, V. S.; MACDONALD, B.; KALLURI, R. Structure and Function of Basement Membranes. Mini review. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, p. 1121-1129, 2007.

LINNOLA R. J.; WERNER L.; PANDEY S. K.; ESCOBAR-GOMEZ M.; ZNOIKO S. L.; APPLE D. J. Adhesion of fibronectin, vitronectin, laminin, and collagen type IV to intraocular lens materials in pseudophakic human autopsy eyes. Part 1: histological sections. **Journal of Cataracts and Refractive Surgery**, v. 26, n. 12, p. 1792-806, 2000.

LOVICU, F. J.; McAVOY, J. W. Localization of acidic fibroblast growth factor, and heparan sulfate proteoglycan in rat lens: implications for lens polarity and growth patterns. **Investigative Ophthalmology Vision Science**, v. 34, p. 3355-3365, 1993.

MARSHALL, G. E.; KONSTAS, A. G. P.; BECHRAKIS, N. E.; LEE, W. An immune electronmicroscope study of the aged human lens capsule. **Experimental Eye Research**, v. 54, p. 393-401, 1992.

MARTIN, C. L. Vitreous and ocular fundus. In: _____. (Ed.). **Ophthalmic disease in veterinary medicine**. London: Manson Publishing, 2005. p. 401-470.

MOHAMAD, N.; GUTIÉRREZ, A.; NÚÑEZ, M.; COCCA, C.; MARTÍN, G.; CRICCO, G.; MEDINA, V.; RIVERA, E.; BERGOC, R. Mitochondrial apoptotic pathways. **Biocell**, v. 29, p. 696-702, 2005.

NANAVATY, M. A.; JOHAR, K.; SIVASANKARAN, M. A.; VASAVADA, A. R.; PRAVEEN, M. R.; ZETTERSTRO, M. C. Effect of trypan blue staining on the density and viability of lens epithelial cells in white cataract. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 32, p. 1483-1488, 2006.

NELSON, L. D.; COX, M. M. Carboidratos e glicobiologia. In: _____. **Princípios da bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Savier Artmed, 2011. p. 249-58.

OFRI, R. Lens. In: MAGGS, D. J.; MILLER, P. E.; OFRI, R. I. (Ed.). **Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology**. 4th ed. St Louis: Saunders Elsevier, p. 258-276. 2008.

OHARAZAWA, H.; IBARAKI, N.; LIN, L. R.; REDDY, V. N. The effects of extracellular matrix on cell attachment, proliferation and migration in a human lens epithelial cell line. **Experimental Eye Research**, v. 69, p. 603-610, 1999.

OZTURK, F.; OSHER, R. H. Capsular staining: recent developments. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 17, p. 42-44, 2006.

PASCARETTA JR., V. **Minha experiência cirúrgica**. Valeu a pena? Natal: Gráfica, 2007. 144 p.

PORTES, A. L. F.; MONTEIRO, M. L.R.; ALLODI, S.; MIGUEL, N.C.O. Effect of trypan blue on lens epithelial cells in human eyes having capsulorhexis. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 33, p. 1135, 2007.

PORTES, A. L. F.; ALMEIDA, A. C.; ALLODI, S.; MONTEIRO, M. L. R.; MIGUEL, N. C. O. Trypan blue staining for capsulorhexis: Ultrastructural effect on lens epithelial cells and capsules. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 36, p. 582-587, 2010.

POT, S. A.; CHANDLER, H. L.; COLITA, C. M. H.; BENTLEY, E.; DUBIELZIG, R. R.; MOSLEY, T. S.; REID, T. W.; MURPHY, C. J. Selenium functionalized intraocular lenses inhibit posterior opacification in an ex vivo canine lens capsular bag assay. **Experimental Eye Research**, v. 89, p. 728-734, 2009.

QUINZE, R. S.; SAFATLE, A. M. V.; BARROS, P. S. M. Avaliação ultra-sonográfica ocular de cães portadores de catarata. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS. CONPAVEPA, 4., 2004, São Paulo. **Anais...**São Paulo: Anclivepa, 2004.

RODRIGUES, E. D.; COSTA, E. F.; PENHA, F. M.; MELO, G. B.; BOTTÓS, J.; DIB, E.; FURLANI, B.; LIMA, V. C.; MAIA, M.; MEYER, C. H.; HOFLING-LIMA, A. L.; FARAH, M. E. The use of vital dyes in ocular surgery. **Survey of Ophthalmology**, v. 54, n. 5, p. 576-617, 2009.

ROSSI, M.; MORITA, H.; SORMUNEN, R.; AIRENNE, S.; KREIVI, M.; WANG, L.; FUKAI, N.; OLSEN, B.; TRYGGYASON, K.; SOININEN, R. Heparan sulfate chains of perlecan are indispensable in the lens capsule but not in the kidney. **EMBO Journal**, v. 22, p. 236-245, 2003.

SAFATLE, A. M. V.; SOUZA, M. S. B.; TEIXEIRA, R. B.; BARROS, P. S. M. Catarata diabética com reabsorção em cães. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, p. 156, 2000. Suplemento.

SIGLE, K. J.; NASSISSE, M. P. Long-term complications after phacoemulsification for cataract removal in dogs: 172 cases (1995-2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 1, p. 74-79, 2006.

SLATTER, D. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005. 685 p.

SMYTH, N.; VATANSEVER, H. S.; MURRAY, P.; MEYER, M.; FRIE, C.; PAULSSON, M. Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. **The Journal of Cell Biology**, v. 144, p. 151-160, 1999.

TAKAMURA, Y.; KUBO, E.; TSUZUKI, S.; AKAGI, Y. Apoptotic cell death in the lens epithelium of rat sugar cataract. **Experimental Eye Research**, v. 77, p. 51-57, 2003.

TILLEY, L. P.; SMITH JR., F. W. K. Diabetes mellitus não-complicada. In: _____. **Consulta Veterinária em 5 minutos**. Espécie canina e felina. 2. ed. Barueri: Manole, 2003. p. 622-623.

TIMPL, R.; BROWN, J. C. Supramolecular assembly of basement membranes. **Bioessays**, v. 18, p. 123-132, 1996.

TIWARI, A.; RAM, J.; LUTHRA-GUPTASARMA, M. Targeting the fibronectin type III in Tenascin-C inhibits epithelial mesenchymal transition in the context of Posterior Capsular Opacification. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 56, n. 1, p. 272-283, 2014.

VAN DER WOERDT, A. Lens-induced uveitis. Review article. **Veterinary Ophthalmology**, v. 3, n. 4, p. 227-234, 2000.

VAUGHAN, D.; ASBURY, T.; RIORDAN-EVA, P. **Oftalmologia geral**. 15. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 432 p.

VENKATESH, R.; TAN, C. S.; SENGUPTA, S.; RAVINDRAN, R. D.; KRISHNAN, K. T.; CHANG, D. F. Phacoemulsification versus manual small-incision cataract surgery for white cataract. **Journal of Cataracts and Refractive Surgery**, v. 36, n. 11, p. 1849-1854, 2010.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Carboidratos**. In: _____. **Fundamentos da bioquímica – A vida em nível molecular**. 2. ed. Arned. 2008. p. 219-24.

WINKLER, J.; WIRBELAUER, C.; FRANK, V.; LAQUA, H. Quantitative distribution of glycosaminoglycans in young and senile (cataractous) anterior lens. **Experimental Eye Research**, v. 72, p. 311-318, 2001.

WOLLENSAK, G.; SPORL, E.; PHAM, D.T. Biomechanical changes in the anterior lens capsule after trypan blue staining. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 30, p. 1526-1530, 2004.

WORMSTONE, M.; WANG, L.; LIU, C. S. C. Posterior capsule opacification. **Experimental Eye Research**, v. 88, p. 257-269, 2009.

YAN, Q.; PERDUE, N.; BLAKE, D.; SAGE, E. H. Absence of SPARC in murine lens epithelium leads to increased exposition of laminin-1 in lens capsule. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 46, n. 12, p. 4652-4660, 2005.

YANG, X.; ZOU, L.; BINRONG, M.; DONG, D.; DAI, H.; LU, X. Tensile strength of lens capsules in eye-bank eyes. **Journal of Cataracts and Refractive Surgery**, v. 24, p. 543-546, 1998.

YURSHENCO, P. D.; SCHITTNY, J. D. Molecular architecture of basement membranes. **The FASEB journal**, v. 4, p. -15771590, 1990.

ZANDY, A. J.; LAKHANI, S.; ZHENG, T.; FLAVELL, R. A.; BASSNETT, S. Role of the executioner caspases during lens development. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 30263-30272, 2005.

APÊNDICE A

APÊNDICE A: Dados não incluídos

Foram colhidas amostras de 4 cães normais, sem qualquer alteração intraocular e logo após suas mortes.

As amostras serviram de guia para a avaliação da presença de alterações nas amostras estudadas e, não foram incluídas neste estudo, já que formariam um grupo completamente diferente do objetivo do estudo, o qual foi basicamente avaliar e comparar as alterações de uma catarata diabética com uma hipermadura.

Figura B – Fotomicrografias de amostras colhidas de cães sem qualquer alteração ocular. Observar em: (A) coloração com HE; (B) PAS; (C) Picrosirius red; (D) Caspase – 3 e (E) Beclina – 1. Observar a integridade da monocamada de epitélio, e sua correta aderência à cápsula (setas pretas finas) em (A) e (B); a coloração em magenta e vermelho, respectivamente, para positividade de proteoglicanos e colágeno IV na cápsula anterior (estrela branca) em (B) e (C) e, por fim, a negatividade de marcação dos anticorpos (seta branca fina) em (C) e (D), observada pela visibilização do DAPI (em azul) marcando o núcleo, mas a ausência da coloração em verde dos anticorpos testados

Fonte: Serviço de Oftalmologia – HOVET – USP.