ANDRÉ LUÍS FREIRE PORTES

**Análise da ação do azul do tripano a 0,1% na
cápsula anterior e no epitélio subcapsular do cristalino:
estudo imunohistoquímico e ultraestrutural**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Mario Luiz Ribeiro Monteiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Nádia Campos de
Oliveira Miguel

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Portes, André Luís Freire

Análise da ação do azul do tripano a 0,1% na cápsula anterior e no epitélio subcapsular do cristalino : estudo imunohistoquímico e ultraestrutural / André Luís Freire Portes. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oftalmologia.

Orientador: Mario Luiz Ribeiro Monteiro.

Co-orientadora: Nádia Campos de Oliveira Miguel.

Descritores: 1.Catarata 2.Cápsula do cristalino 3.Epitélio subcapsular 4.Azul tripano 5.Morte celular 6.Apoptose 7.Autofagia

USP/FM/DBD-240/10

DEDICATÓRIA

“...se eu viver eternamente e todos os meus
sonhos se tornarem realidade, minhas
lembranças de amor serão de vocês”

Plácido Domingo

À minha amada família, em especial
ao meu pai, Luiz Carlos,
minha esposa, Rita,
e meu filho, João.

AGRADECIMENTOS

“Todo pensamento é solitário, mas a sua realização é grupal. Toda atitude é individual, mas a sua construção é coletiva”

Godar

Ao Prof. Newton Kara José, por sempre ter acreditado em mim.

Ao Prof. Mario Luiz Ribeiro Monteiro, pela orientação, dedicação e seriedade que tornaram este trabalho possível.

A Profa. Nádia Campos de Oliveira Miguel, pela orientação e confiança em mim dispensada.

Ao Prof. Aberlardo Couto Junior, pelo exemplo de persistência e determinação, por me mostrar que nada é impossível.

A Profa. Silvana Allodi, pela orientação e entusiasmo que sempre me dispensou.

A Regina Ferreira de Almeida responsável pela secretaria de pós-graduação, que mesmo distante sempre esteve presente, por cuidar de mim e principalmente pela amizade que criamos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

LISTA DE QUADROS E TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	16
3	MÉTODOS	18
3.1	População do estudo.....	19
3.2	Procedimento cirúrgico.....	21
3.3	Análises laboratoriais	25
3.4	Análise estatística.....	31
4	RESULTADOS	32
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÕES	51
7	ANEXOS.....	53
7.1	Anexo A.....	54
7.2	Anexo B.....	55
7.3	Anexo C.....	56
7.4	Anexo D.....	57
7.5	Anexo E.....	58
7.6	Anexo F	59
7.7	Anexo G	60
8	REFERÊNCIAS	61

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

*	Asterisco
✦, ★	Estrela
⇨	Seta branca
➡	Seta preta
●	Circulo preto
⊙	Circulo branco
°	Graus
=	Igual
±	Mais ou menos
%	Por cento
®	Marca registrada
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μm	Micrômetro
°C	Grau Celsius
AT	Azul de tripano
AV	Acuidade visual
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAPPesq	Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa
CCC	Capsulotomia curvilínea contínua
CBO	Conselho Brasileiro de Oftalmologia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
Dr.	Doutor
Ed.	Edição
EGF	Fator de crescimento derivado do epitélio
ESC	Epitélio subcapsular cristalino
EUA	Estados Unidos da América
e cols.	e colaboradores

FGF	Fator de crescimento fibroblástico
GAGs	Glicosaminoglicanos
HB-EGF	Fator de crescimento epitelial ligado a heparina
HE	Hematoxilina-eosina
HGB	Hospital Geral de Bonsucesso
kV	Kilovolts
LIO	Lente intra-ocular
IC	Intervalo da confiança
<i>Inc.</i>	<i>Incorporation</i>
M	Molar
MB	Membrana basal
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Mg	Miligrama
Min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MO	Microscopia óptica
MS	Ministério de Saúde
nm	Nanômetros
n	Número de pacientes da amostra
OCP	Opacificação da cápsula posterior
p.	Página
p	Probabilidade estatística
PBS	Solução tampão fosfato
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
pH	Potencial Hidrogênionico
PIO	Pressão intra-ocular
Prof.	Professor
PSARC	Proteína secretada ácida rica em cisteína
SBO	Sociedade Brasileira de Oftalmologia
TdT	Enzima terminal deoxynucleotidyl transferase
TGF	Fator de crescimento transformante

TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling</i>
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UV	Ultra-violeta
USP	Universidade de São Paulo
USA	<i>United States of América.</i>
Vol	Volume
X	Vezez

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

- Figura 1 - Catarata nuclear grau I e subcapsular posterior (2+/4+), incluída no protocolo de estudo.....20
- Figura 2 - Demonstrando o processamento laboratorial das amostras para observação no MET. A - Material incluído em bloco de resina Polyeb 812, necessário para o corte no ultramicrotomo. B - Grades para montagem das amostras já cortadas e contrastadas que serão colocadas no MET 28
- Figura 3 - Aparelhos utilizados no estudo necessários para observação e corte das amostras respectivamente. A - Microscópio eletrônico de transmissão modelo EM 900 da marca Zeiss ®. B - Ultramicrotomo modelo MT 6000 XL-RMC da marca Reichert ®.....29
- Figura 4 - Marcações celulares para as medidas morfométricas. A - As linhas amarelas demarcam os perfis das bordas celulares do ESC e da cápsula, enquanto que as linhas vermelhas indicam as suas espessuras. B - As linhas verdes demarcam os perfis das bordas celular e nuclear. A cor azul indica a área nuclear e a linha vermelha a espessura celular. As linhas amarelas marcam as distâncias nos maiores eixos nucleares perpendiculares (horizontal e vertical) 30
- Figura 5 - Lâminas MO coradas por HE nos grupos controle (A) e experimental (B). Observa-se a cápsula (asterisco - *) e os seus limites humoral (setas pretas - ►) e lenticular (setas brancas - ⇨). O ESC (estrela - +) está aderido em toda extensão a cápsula adjacente. Imagens com magnificação de 400x.....35
- Figura 6 - Lâmina em que foi feita a técnica do Tunel no grupo de amostras coradas com AT. Encontramos os núcleos celulares bem individualizados marcados em coloração mais escura, tons marrons (setas brancas - ⇨), indicando presença de morte celular por apoptose 36
- Figura 7 - Lâmina em que foi feita técnica de Tunel no grupo controle. Não foi confirmado apoptose celular por não ter sido observada marcação nuclear decorrente da reação.....37

Figura 8 -	Laminas dos testículos de ratos para o controle da reação de Tunel. A - Controle negativo demonstrando que não há marcação nuclear, devido a reação incompleta sem adição da enzima TdT. Escala de 20µm. B - Controle positivo demonstrando a presença de marcação nuclear (setas pretas - →) e expressão de apoptose. Escala de 10 µm 37
Figura 9 -	Laminas observadas na MO com filtros de fluorescência para análise de morte celular por autofagia. A - Não há marcação epitelial no grupo controle. B - No grupo de amostras submetidas ao AT há marcação positiva (setas brancas - ⇨) para o anticorpo beclina-1 e expressão de autofagia.....38
Figura 10 -	Eletron-micrografias da cápsula e das células do ESC que não foram expostos ao AT. A - Observa-se a cápsula (círculo preto), o citoplasma elétron-lucente (círculos brancos) e o núcleo eucromático (estrela). Aumento de 12.000x com escala de 3µm. B - Mitocôndrias com padrão morfológico normal demonstrado pelas cristas externas (setas brancas - ⇨) e cristas internas (setas pretas - ➡). Aumento de 20.000x com escala de 1,1µm 39
Figura 11 -	Eletron-micrografias da cápsula e das células do ESC que foram submetidos ao AT. A - Observa-se irregularidade no limite nuclear (setas pretas - ➡), modificação no padrão das organelas citoplasmáticas com rupturas nos perfis mitocondriais (setas brancas - ⇨).Aumento de 12.000x, com escala de 3µm. B - Nota-se aumento da eletron-densidade citoplasmática e desorganização nas cristas mitocondriais (seta branca - ⇨). Aumento de 40.000x com escala de 0.43µm 40
Gráfico 1 -	Modelo <i>box plot</i> demonstrando a distribuição dos valores da espessura (µm) da cápsula e do ESC nos grupos controle e experimental 41
Gráfico 2 -	Modelo <i>box plot</i> demonstrando a distribuição dos valores na relação perímetro área (µm/µm ²) do núcleo no ESC entre grupos controle e experimental 43
Gráfico 3 -	Modelo <i>box plot</i> demonstrando a distribuição dos valores na relação dos maiores eixos nucleares perpendiculares (µm) no ESC entre grupos controle e experimental 44

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Divisão dos pacientes segundo o uso do azul de tripano com a análise laboratorial realizada	25
Tabela 1 -	Distribuição dos pacientes segundo idade (anos)	33
Tabela 2 -	Distribuição dos pacientes segundo a análise laboratorial realizada	34
Tabela 3 -	Distribuição dos pacientes segundo a análise laboratorial realizada por meio da MO	34
Tabela 4 -	Distribuição dos valores da espessura (μm) da cápsula e do ESC nos grupos controle e experimental	41
Tabela 5 -	Distribuição dos valores na relação perímetro área ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$) do núcleo no ESC entre grupos controle e experimental	43
Tabela 6 -	Distribuição dos valores na relação dos maiores eixo nucleares perpendiculares (μm) no ESC entre grupos controle e experimental	44

RESUMO

Portes ALF. *Análise da ação do azul do tripano a 0,1% na cápsula anterior e no epitélio subcapsular do cristalino: estudo imunohistoquímico e ultraestrutural* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 74 p.

O objetivo do estudo foi analisar a cápsula e o epitélio subcapsular cristalino (ESC) de pacientes submetidos à capsulotomia curvilínea contínua (CCC) utilizando o corante azul de tripano (AT) a 0,1%, através de microscopia óptica (MO), da técnica TUNEL, de imunohistoquímica e de microscopia eletrônica transmissão (MET). Realizamos um estudo prospectivo, controlado e randomizado utilizando 30 amostras de cápsulas e ESC obtidos de pacientes após CCC durante cirurgia de facectomia. Essas amostras foram divididas em dois grupos (15 espécimes cada) um utilizando o AT (grupo experimental) no ato cirúrgico e o outro sem o uso do corante (grupo controle). As cápsulas e o ESC destes grupos foram fixados e processados para análises estruturais posteriores com técnicas de MO de rotina, técnica TUNEL para detecção de morte celular por apoptose, imunohistoquímica para analisar a expressão da beclina-1 (um marcador de morte celular por autofagia), além de análise ultraestrutural por meio da MET. Foram realizadas análises morfométricas das imagens de microscopia após captura e digitalização, utilizando o programa Image Pró Plus (Cybernetics®, USA). Foram encontrados resultados positivos para a expressão de morte celular por apoptose e por autofagia no grupo submetido ao uso do AT, enquanto que no grupo controle os resultados foram negativos. As análises através da MET do ESC mostraram alterações em células coradas com o AT, incluindo ruptura mitocondrial, dilatação das cisternas do retículo endoplasmático, aumento da eletrondensidade citoplasmática e nuclear, e alteração no perfil nuclear. Os resultados estatísticos obtidos pelo teste de Mann-Whitney a partir da morfometria obtida de micrografias, demonstraram diferenças morfológicas significativas entre os grupos estudados, tanto nas dimensões dos maiores eixos nucleares, quanto na relação perímetro/área do núcleo celular ($p=0,03$). Em relação à espessura da cápsula, do epitélio subcapsular e do conjunto dessas estruturas obtidas a partir da MO de rotina não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,1$). O AT provoca no ESC toxicidade celular com sinais indicativos de morte celular. Observamos nos aspectos morfológicos e moleculares morte celular tanto pelo mecanismo de apoptose quanto de autofagia. A partir destes achados podemos sugerir que a ação do AT, talvez possa ajudar a prevenir ou reduzir a opacificação da cápsula posterior do cristalino no período pós-operatório das facectomias.

Descritores: 1.Catarata 2.Cápsula do cristalino 3.Epitélio subcapsular 4.Azul tripano 5.Morte celular 6.Apoptose 7.Autofagia

---

SUMMARY

Portes ALF. *Trypan blue 0.1% action analysis on anterior capsule and lens epithelial cells: Immunohistochemistry and ultrastructural study* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 74 p.

The purpose of this study was to evaluate the effect of trypan blue (TB) 0.1% staining on lens epithelial cells (LECs) and capsules of patients undergoing capsulorhexis using routine optical microscopy (OM), TUNEL technique, immunohistochemistry and transmission electron microscopy (TEM). In a prospective controlled and randomized study we evaluated 30 samples of capsules with LECs obtained after capsulorhexis during cataract surgery. Samples were randomly assigned to one of two groups (15 specimens each), one submitted to TB (experimental group) during the surgery and the other without the dye (control group). The capsule and the LECs of both groups were fixed and processed for later structural analysis with routine optical microscopy, immunohistochemistry for beclin-1 expression (a marker of cell death by autophagy), and the TUNEL technique to detect apoptosis, in addition to ultra-structural analysis by TEM. Morphometrical analysis were performed by using the Image Pro Plus software (Cybernetics®, USA). In the TB-stained group we have found positive results for the expression of cell death by autophagy and apoptosis while in the control group the results were negative. Analysis of LEC by TEM showed abnormalities in TB-stained cells including mitochondrial disruption, dilation of the endoplasmic reticulum cisterns, increased cytoplasmic and nuclear electron density and abnormalities in the nuclear profile. Statistical analysis using the Mann-Whitney test on morphometric data from micrographies showed significant morphologic differences between the two groups, both regarding longest nuclear axis difference and the ratio between the total nuclear perimeter and the cell area ($p=0.03$). No statistically significant difference was observed in capsule thickness, the LEC and the grouping of these two structures obtained from routine OM ($p=0.1$). Trypan blue is toxic to LECs, and cause abnormalities indicative of cell death. We observed molecular and morphologic aspects of cell death both by the mechanism of apoptosis and autophagy. Our findings lend support to the hypothesis that staining with 0.1% TB can help prevent or reduce the incidence of posterior capsule opacification following cataract surgery.

Descriptors: 1.Cataract 2.Lens capsule 3.Lens epithelial cells 4.Trypan blue 5.Cell death 6.Apoptosis 7.Autophagy

---

1 INTRODUÇÃO

O cristalino é uma estrutura, transparente, biconvexa, sustentada por fibras zônulares, situado na câmara posterior do globo ocular. Possui relação, anteriormente, com a pupila e a face posterior da íris, lateralmente está distante 0,5 milímetros (mm) do corpo ciliar, e posteriormente situa-se antes da cavidade vítrea ⁽¹⁾.

A sua superfície anterior tem uma curvatura em forma de elipse e é mais plana que a superfície posterior. Os pontos centrais na superfície anterior e posterior são chamados de pólos, e uma linha entre os dois pólos forma o eixo central do cristalino. Chama-se de equador a porção mais periférica e circular que une os dois pólos, principal local onde se insere o ligamento suspensor do cristalino ^(1, 2, 3).

Suas dimensões são aproximadamente 9 a 10mm de diâmetro equatorial e 3,5 a 4,5mm de espessura ⁽⁴⁾. Estima-se que ao longo da vida o cristalino tenha um aumento progressivo da sua espessura variando de 27,38 a 54,86%, e no seu diâmetro de 42,85 a 50% ^(4,5,6,7).

Num indivíduo adulto normal é constituído de 65% de água e 35% de proteínas, lipídeos, íons e metabólitos ⁽⁸⁾. O cristalino é desprovido de vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos, possuindo apenas um tipo de linhagem celular, a epitelial ⁽⁹⁾. Histologicamente o cristalino pode ser dividido em 3 porções: a cápsula, o epitélio subcapsular e as fibras cristalinianas ^(10, 11).

A cápsula é uma membrana basal (MB) modificada e especializada, acelular, transparente, elástica e homogênea ^(12, 13). É a porção mais externa do cristalino e o envolve totalmente, possuindo uma face interna em contato com o epitélio subcapsular do cristalino (ESC) chamada de lenticular, e outra externa chamada de humoral ⁽¹⁴⁾. Suas dimensões são de aproximadamente 10 micrômetros (μm) de espessura na superfície anterior, 20 μm no equador, o local mais espesso onde as fibras zônulares se aderem, e 5 μm na superfície posterior ^(7, 15).

A cápsula do cristalino é constituída por uma matrix extracelular (MEC) composta de laminina e fibronectina, que se interagem com colágeno do tipo IV e proteoglicanas ^(10, 12, 16).

A laminina que confere estabilidade a toda estrutura ⁽¹⁶⁾ é uma glicoproteína não-colagênica composta de três cadeias de polipeptídeos, que juntamente com o colágeno tipo IV são os componentes predominantes da cápsula, secretados diretamente pelo próprio ESC. A fibronectina uma outra glicoproteína com duas cadeias secretada pelos fibroblastos, também pode ser encontrada na MEC, porém em menor quantidade, e completa a sua formação estrutural principal, atuando como uma importante molécula de adesão ^(12, 17).

Os agregados proteoglicanos são formados por associações de grandes polissacarídeos com proteínas. Existem diferentes polímeros de sacarídeos que combinados com resíduos de sulfato recebem a denominação de glicosaminoglicanos (GAGs). Os principais GAGs são o

sulfato de condroitina, dermatan sulfato e heparan sulfato, e estão distribuídos por toda cápsula, mais concentrados nas suas superfícies lenticular e humoral ⁽¹⁴⁾. Dentre outras funções os proteoglicanos estabilizam os componentes da superfície celular e interagem com os fatores de crescimento presentes na MEC. ^(12, 17).

Destacamos ainda a presença das integrinas, proteínas de adesão celular, que tem afinidade pela laminina e fibronectina, interagindo a MB com o citoesqueleto do ESC. Além de fortalecer as interações celulares, são sinalizadoras de eventos como proliferação e diferenciação celular, importantes etapas no processo de formação das fibras cristalínias ^(13, 18).

Outros componentes também já foram identificados na MEC, como a enactina e a PSARC, uma proteína secretada ácida rica em cisteína, que desempenham diferentes papéis. A enactina é uma glicoproteína que atua como ponte de ligação entre o colágeno tipo IV e a laminina, desempenhando uma função estrutural na arquitetura da cápsula do cristalino ⁽¹²⁾. A PSARC tem uma ação regulatória na produção e degradação das proteínas produzidas pela MEC, principalmente na laminina, influenciando indiretamente a adesão do ESC e a integridade da estrutura capsular ⁽¹⁶⁾.

Além de definir os limites do cristalino e desempenhar um papel de suporte para o ESC, a cápsula atua como uma membrana de permeabilidade seletiva no seu metabolismo, permitindo não somente a sua nutrição e hidratação a partir do humor aquoso, mas também a passagem de

outros elementos moleculares que tem participação ativa na regulação e manutenção do ESC, interferindo nos seus mecanismos de adesão, migração e diferenciação celular ^(17,19).

O ESC está situado logo em seguida a cápsula, e é constituído de uma única camada de células que se estendem da porção anterior até a porção equatorial do cristalino, variando morfológicamente de acordo com o local. No pólo anterior tendem a ser cúbicas com formato poliédrico, passando por uma forma cilíndrica à medida que se localizam mais periféricamente, até chegar à região equatorial, onde se alongam com orientação oblíqua e assumem uma forma piramidal ⁽¹⁾.

Os mecanismos de adesão das células epiteliais são feitos nos domínios laterais, com adesões intercelulares mediadas por junções comunicantes, presentes também com complexos juncionais no seu domínio apical, local de interface com as fibras cristalinianas ^(1, 10, 20). Existe ainda um terceiro domínio que fica em contato com a cápsula e é chamado de basal. Nesta superfície os filamentos de actina intracelulares que compõem o citoesqueleto das células epiteliais, são ancorados por meio das integrinas a especializações específicas extracelulares da MB, como a laminina e fibronectina ⁽²¹⁾. Este tipo de adesão celular à cápsula, também influi nos mecanismos de sinalização molecular a partir da célula epitelial para alterar MEC ou, a partir da MB para o ESC, influenciando nos processos de proteção, proliferação e diferenciação celular ^(18, 22).

O cristalino é um órgão que cresce por toda a vida, mediado principalmente pela formação contínua de fibras cristalínicas originadas do seu epitélio. Sabe-se que a atividade mitótica do ESC ocorre tanto na sua porção anterior central quanto no equador, entretanto de forma distinta ⁽²³⁾.

A proliferação celular na sua porção anterior é menos intensa e tem um ciclo mais lento, estando associada principalmente a uma resposta produzida por alterações celulares a um dano tecidual local ^(22, 23). Paradoxalmente, na região equatorial também chamada de zona germinativa, a proliferação celular ocorre regularmente, é intensa e está associada também ao processo de diferenciação celular na formação contínua das fibras cristalínicas ^(20, 24).

A presença de diferentes tipos de receptores para o estímulo proliferativo e de suas concentrações entre as células destas regiões, podem refletir a variabilidade nas respostas encontradas. Os receptores de membrana da proteína-G mediados pela interação com a acetilcolina, numa via de estímulo cálcio dependente, atuam sinalizando apenas o epitélio anterior. Na região equatorial a sinalização é feita pelos receptores tirosina-quinase e sua interação com os fatores de crescimento derivados do epitélio (EGF) ^(20, 24).

Os EGFs fazem parte de um grupo de proteínas que também incluem o fator de crescimento transformante (TGF), fator de crescimento epitelial ligado a heparina (HB-EGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e, dependendo do tipo de

proteína que se combine com o receptor, a sinalização molecular poderá ser não somente para a proliferação, mas também para migração e diferenciação celular ⁽²⁴⁾. Existem várias vias de sinalização molecular, e os mecanismos que vão regular estas interações moleculares podem ser controlados pela própria célula, quando a molécula for produzida por ela mesma (sinalização autócrina), ou quando a molécula for produzida por outra célula (sinalização parácrina). O que vai determinar a maior expressão de uma molécula ou a atividade de uma via é o metabolismo local, fisiológico ou em resposta a uma modificação do meio, portanto envolvendo todo o complexo cápsula - ESC ⁽²⁵⁾.

Na região equatorial observa-se a diferenciação do epitélio subcapsular nas fibras cristalinianas. Na vida adulta, este processo começa com uma modificação estrutural na célula epitelial, que vai se alongando, perdendo sua adesão à cápsula e se afastando progressivamente à medida que há perda das organelas citoplasmáticas e do seu núcleo fragmentado ^(9, 10).

As fibras cristalinianas constituem a maior porção do cristalino, são proteínas solúveis em água, formadas durante toda a vida do indivíduo, que vão se interdigitando e se acumulando continuamente num padrão específico de camadas concêntricas e regulares chamadas de lamelas cristalinianas. O tamanho das fibras cristalinianas não é longo o suficiente para cobrir toda extensão do cristalino, e o seu encontro ocorre formando as suturas anterior e posterior na sua região central ⁽¹⁾. As lamelas vão se

comprimindo e compactando, desenvolvendo uma estrutura interna mais rígida chamada de núcleo, que é envolto por uma camada cortical menos densa ⁽⁴⁾. Como as fibras não são repostas e sim acumuladas, pois não existe no cristalino um mecanismo de renovação, a sua conservação se torna um processo importante para manutenção da função visual ^(26, 27). A solubilidade das fibras em relação à alta concentração celular e protéica do meio mantém a sua transparência e longevidade ^(26, 28).

Existem três tipos principais de fibras chamadas de cristalinas α -, β -, e γ -, unidas por especializações de aderência e junções comunicantes ^(10, 28). As cristalinas não são proteínas específicas do cristalino e já foram detectadas também na retina, coração, rins e baço ^(27, 29, 30). Todas as suas funções ainda não foram bem estabelecidas, mas no cristalino sabe-se que elas atuam na transmissão da luz, tanto por estruturar a forma do órgão, são mais de 90% de toda massa protéica, quanto na sua transparência e índice refrativo ^(30, 31, 32).

O cristalino tem como a principal função a transmissão da luz, como parte do sistema óptico do globo ocular. É o componente deste sistema que mais sofre alterações refratométricas, tanto de causa fisiológica nos mecanismos de acomodação, quanto de origem patológica representados principalmente pelas cataratas. Atua como uma lente convergente de aproximadamente 20 dioptrias refratando os raios luminosos para um foco na retina. Sua ação no sistema de acomodação juntamente com as fibras zônulares e o músculo ciliar possibilitam o foco em diferentes distâncias

^(33,34). Neste processo fisiológico as modificações na curvatura da sua superfície anterior, tornando-a mais ou menos convergente, permitem o foco na distância desejada ⁽³⁴⁾. Estas modificações fisiológicas só são possíveis tanto pela propriedade elástica da cápsula que permite um estiramento de até 62% do seu tamanho total antes de sofrer ruptura ^(35, 36), quanto pelos diferentes locais de inserção das fibras zônulares ^(2, 34).

Quando o indivíduo é jovem e o cristalino flexível e elástico a amplitude de acomodação é maior, sofrendo redução gradativa com o avançar da idade ⁽³⁴⁾. No entanto já foi demonstrado que apesar da cápsula sofrer um aumento na sua espessura e redução da sua elasticidade na população mais idosa, ⁽³⁵⁾ a sua capacidade biomecânica continua suficiente para acomodar, sugerindo que existam outros mecanismos mais importantes no aparecimento da presbiopia ⁽³⁶⁾.

Observa-se com o avançar da idade, principalmente após os 40 anos, mudanças mais evidentes na estrutura do cristalino ⁽³⁷⁾. Há um aumento da sua densidade, tamanho e pigmentação, que podem degradar a sua qualidade óptica ^(6, 37). As alterações morfológicas quando causam desnaturação protéica com fragmentação e ruptura das fibras cristalinas, edema com aumento dos espaços intercelulares, concentração de pigmento excessiva, principalmente urocromo, estão presentes nas opacificações do cristalino ^(4, 38, 39).

Quando opacificado o cristalino causa baixa de acuidade visual e forma a catarata, que é responsável por 50% dos casos de cegueira no mundo, acometendo aproximadamente 17 milhões de pessoas ^(40,41).

A prevalência da catarata numa população aumenta de acordo com a idade, aos 60 anos é em torno de 20%, passando para 42,8 % aos 70 anos e acima de 60% em indivíduos com 80 anos ou mais ^(40,42). Estima-se atualmente que com o aumento da expectativa de vida ocorra um aumento na sua incidência, e que a prevalência dos casos de cegueira por catarata deva ser triplicada até o ano de 2020 ^(40,43).

As cataratas podem ter causas congênitas (distúrbios metabólicos, infecções intra-uterinas) ou adquiridas (associada à idade, traumática, tóxica, inflamatória) ⁽⁴⁾. O tipo mais comum de catarata é aquela proveniente do processo de envelhecimento natural das pessoas, sendo uma alteração multifatorial que pode sofrer influência do tabagismo, diabetes mellitus, exposição à radiação ultra-violeta (UV).⁽⁴⁾, variando individualmente.

Dependendo do tipo e intensidade da opacificação do cristalino, o paciente refere desde um ofuscamento com embaçamento visual até perda importante da visão, com percepção luminosa.

A catarata é uma causa de cegueira tratável, sendo o único tratamento eficaz que existe atualmente a sua extração cirúrgica. Trabalhos mostram que a relutância e a rejeição cirúrgica por medo das conseqüências do ato cirúrgico (cegueira e morte) são de 40% no Brasil e 20% nos Estados Unidos da América (EUA). Tais fatos se originam por falta de informação

sobre a cirurgia, criando falsas concepções a seu respeito ⁽⁴⁰⁾. A limitação que o paciente tem para o acesso à cirurgia é outro importante fator que contribui para o aumento da prevalência da catarata, comum em regiões de baixo nível sócio-econômico, onde o programa de saúde é deficiente. No Brasil as campanhas comunitárias de prevenção à cegueira idealizadas e coordenadas pelo Conselho Brasileiro de Oftalmologia (CBO) e a Sociedade Brasileira de Oftalmologia (SBO), apoiadas pelo Ministério da Saúde (MS), têm contribuído em muito para a melhoria da qualidade de saúde visual nos pacientes de baixa renda, diminuindo as estatísticas de cegueira, inclusive por catarata ⁽⁴³⁾.

Nos últimos anos a cirurgia de catarata teve um grande aprimoramento tecnológico do instrumental cirúrgico, aparelhagem (microscópios e facoemulsificadores), lentes intra-oculares (LIO), medicamentos viscoelásticos, assim como o advento de diferentes técnicas que podem ser utilizadas para extração da catarata (extra-capsular e facoemulsificação) permitiu um aperfeiçoamento da técnica, otimizando os resultados, diminuindo as complicações e promovendo uma reabilitação visual mais rápida. Entre os melhoramentos destacamos a introdução da capsulotomia curvilínea contínua (CCC) também chamada de “*capsulorhexis*”, por Gimbel e Neuhann em 1990 ⁽⁴⁴⁾. Com esta técnica, durante a cirurgia, as possibilidades de roturas no saco capsular do cristalino diminuem muito, principalmente quando se está facoemulsificando o núcleo ou realizando irrigação e aspiração das massas corticais. Outra vantagem é a possibilidade de se implantar uma LIO dentro do saco capsular

cristaliniano se este estiver íntegro, ou sobre o sulco ciliar acima da porção anterior da cápsula se houver rompimento da sua porção posterior⁽⁴⁵⁾, porém tal técnica exige habilidade e treinamento por parte do cirurgião pois não é um procedimento fácil.

O uso de viscoeláticos coesivos como o hialuronato de sódio, facilitaram em muito a realização da CCC, oferecendo ao cirurgião a contra pressão necessária para um melhor controle do movimento durante o procedimento ⁽⁴⁶⁾.

Para se fazer a CCC era necessário também a visibilização do reflexo vermelho retiniano, que provoca um contraste com a cápsula anterior do cristalino permitindo a sua observação e realização. No caso de cataratas mais avançadas que não tivessem o reflexo vermelho retiniano e que não tinham uma observação adequada da cápsula anterior, a CCC não poderia ser feita, limitando este procedimento a determinados tipos de cataratas. Diversas estratégias para a realização da CCC em cataratas sem auxílio do reflexo vermelho retiniano foram sugeridas, como o uso de endoiluminação por fibra óptica, endodiatermia, CCC em dois tempos sob alta magnificação, uso de sangue autólogo e de corantes (azul de metileno, fluoresceína sódica, indocianina verde e azul de tripano) ^(45 -50) para a cápsula anterior do cristalino.

Atualmente o método auxiliar mais utilizado é uso do azul de tripano (AT), um corante vital que foi muito utilizado para avaliar a camada endotelial corneana nos transplantes de córnea ⁽⁵¹⁾. A sua utilização em concentrações

de até 0,3%, além de não causar toxicidade corneana, permite a transparência necessária para realização da cirurgia ⁽⁴⁵⁾; entretanto concentrações de 0,0125% já são satisfatórias para corar a cápsula anterior do cristalino ⁽⁵²⁾.

Durante a cirurgia se injeta o corante na câmara anterior, que cora a cápsula anterior do cristalino permitindo sua melhor visibilização. Sua injeção na câmara anterior pode ser feita precedida de ar na seringa, diluído com solução salina balanceada para uso intra-ocular, ou como alguns trabalhos demonstram recentemente, já misturado ao agente viscoelástico ^(53,54).

A sua utilização e benefícios não se restringem apenas a facilidade de realizar CCC em olhos sem reflexo vermelho uma vez que no caso de cirurgias onde o reflexo vermelho está presente, o uso do AT permite uma melhor visibilização da cápsula anterior do cristalino facilitando também sua realização, principalmente quando realizada por cirurgiões menos experientes.

Outro benefício durante a facoemulsificação realizada com o uso do AT é a observação de todo o limite da CCC, mesmo em alguns casos de opacidade corneana ⁽⁵⁵⁾, aumentando a segurança do cirurgião por diminuir a chance deste atingi-la inadvertidamente, o que poderia causar complicações cirúrgicas. O implante da LIO também é facilitado pela maior visibilidade da cápsula cristaliniana, pois permite ao cirurgião maior discernimento entre o sulco ciliar e o saco capsular. A redução na curva de

aprendizado ⁽⁵⁶⁾ e o seu baixo custo têm ajudado a popularizar o uso desse corante.

Hoje é amplamente usado em facectomia e o seu uso intra-operatório já possui acompanhamento de oito anos atestando tanto sua segurança quanto a ausência de toxicidade no segmento anterior ⁽⁴⁵⁾. Outros autores, entretanto, demonstram que o AT não é totalmente inócuo pois quando penetra a cavidade vítrea pode ser tóxico para a retina ⁽⁵⁷⁾, e quando associado a uma lente intra-ocular do tipo hidrofílica expansível, a sua utilização deve ser restringida já que esta lente poderá se impregnar com AT ⁽⁵⁸⁾, levando a alterações visuais no pós-operatório e comprometendo o resultado visual final.

Os seus efeitos em relação à biomecânica do saco capsular foram analisados por diferentes pesquisadores, que reproduziram resultados semelhantes no que diz respeito a alterações na sua resistência ⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾. Já em relação à morfologia da cápsula anterior, observa-se uma variabilidade nos resultados ⁽⁶²⁻⁶⁴⁾, demonstrando a necessidade de novas análises para se acrescentar mais informações e estabelecer melhor a sua ação.

Outro foco atual de pesquisa em relação à ação do AT diz respeito à sua ação nas células do ESC. Foi demonstrado que a densidade e viabilidade celular do ESC são modificadas e há sinais morfológicos de toxicidade celular ^(63,65). O que ainda não está esclarecido são quais as vias moleculares responsáveis pelos eventos desencadeados que vão determinar o tipo de toxicidade e sua intensidade.

Sabe-se que a opacificação da cápsula posterior (OCP) do cristalino é uma importante causa de baixa visual, e a complicação tardia mais comum no período pós-operatório das facectomias ⁽⁶⁶⁾. Esse processo resulta da proliferação, migração e diferenciação das células remanescentes do ESC, que vão progressivamente levando a perda da transparência capsular posterior ⁽⁶⁷⁾. A ação tóxica do AT nestas células pode modificar este processo, e o resultado da sua morte poderia prevenir ou reduzir a OCP.

Uma linha de pesquisa com estudos que mostrem a ação do AT no ESC deverá contribuir para o esclarecimento das alterações estruturais por ele causada e no entendimento das bases moleculares dos mecanismos envolvidos.

---

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Comparar aspectos morfológicos e moleculares da cápsula anterior e do ESC de seres humanos, obtidos a partir de CCC em facectomias realizadas com e sem a utilização do corante azul de tripano a 0,1%.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar estruturalmente a cápsula anterior e o ESC por meio da microscopia óptica (MO) de rotina.
- Analisar ultraestruturalmente a cápsula anterior e o ESC por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET).
- Analisar o ESC por meio da técnica TUNEL para evidenciar morte celular por apoptose.
- Analisar o ESC por meio de imunohistoquímica para observar a expressão da beclina e evidenciar morte celular por autofagia.
- Analisar morfometricamente a espessura da cápsula anterior e do ESC. Analisar as células do ESC individualmente, quanto às relações entre sua área e o perímetro nuclear, assim como a relação entre os maiores eixos dos seus núcleos utilizando fotomicrografias e eletronicografias.

---

3 MÉTODOS

Estudo prospectivo, controlado e randomizado, realizado entre junho de 2007 e novembro de 2008. O protocolo utilizado para esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade da São Paulo (USP) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral de Bonsucesso (HGB) no Rio de Janeiro, em concordância com o Laboratório de Neurohistologia e Ultraestrutura do Departamento de Histologia e Embriologia do Programa de Biologia Celular e Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Todos os pacientes envolvidos assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

3.1 População de estudo

Este trabalho incluiu 30 pacientes adultos de ambos os sexos que foram triados no ambulatório de oftalmologia com diagnóstico de catarata e submetidos à facectomia pela técnica de facoemulsificação com implante de LIO no centro cirúrgico oftalmológico do HGB. Foram incluídos pacientes com as seguintes condições:

- Idade entre 50 e 80 anos;

- Diagnóstico de catarata dos tipos nucleares, graus I e II, e/ou subcapsulares posteriores até (2+/4), semelhantes ao do padrão demonstrado na figura 1.

Figura 1 - Catarata nuclear grau I e subcapsular posterior (2+/4+), incluída no protocolo de estudo.

- Concordância com o termo de consentimento livre e esclarecido assinado no exame de seleção;
- Capacidade de aderir às consultas periódicas e realizar todos os exames complementares oculares e sistêmicos necessários ao procedimento cirúrgico;

Foram excluídos pacientes com:

- Diabetes melittus;
- Glaucoma;

- Trauma ocular;
- Inflamação aguda ou crônica no segmento anterior;
- Quaisquer alterações na cápsula do cristalino observadas no exame oftalmológico;
- Cataratas que não se enquadrem nas estabelecidas nos critérios de inclusão, como subcapsulares anteriores, corticais, capsulares (anteriores e posteriores), associadas à pseudo-esfoliação, hiper maduras e *nigras*;
- História de uso de drogas que possam interferir no processo de formação da catarata ou causar alterações estruturais no cristalino;
- Condição médica sistêmica ou ocular que pudesse interferir no cumprimento total do estudo de acordo com o julgamento clínico do investigador;
- Qualquer tipo de violação do protocolo.

3.2 Procedimento cirúrgico

Todos os pacientes avaliados no exame oftalmológico foram submetidos a:

- Medida da acuidade visual (AV) pela tabela de Snellen após exame refracional;
- Biomicroscopia do segmento anterior em lâmpada de fenda;

- Medida da pressão intra-ocular (PIO) com tonômetro de aplanção de Goldmann;
- Biomicroscopia do segmento posterior realizada com lente asférica de campo grande com 90 dioptrias (modelo superfield da marca Volk®). Dilatação prévia com instilação tópica de fenilefrina a 10% e de tropicamida a 1% com intervalos de aproximados 5 a 10 minutos entre as aplicações;
- Ceratometria;
- Ecobiometria;

Para o procedimento cirúrgico todos os pacientes realizaram os seguintes exames complementares:

- Hemograma e coagulograma
- Glicemia de jejum
- Raio - X de tórax nas incidência postero-anterior e perfil
- Eletrocardiograma
- Exame de urina tipo I
- Avaliação clínica com determinação do risco cirúrgico

No centro cirúrgico as pupilas dos pacientes foram dilatadas com a instilação de colírio de fenilefrina a 10% e tropicamida a 1% com intervalos de aproximadamente 5 a 10 minutos (min) entre as aplicações, de 4 a 7

vezes, necessárias para se obter uma midríase com diâmetro pupilar de no mínimo 7 mm.

Sob monitorização assistida, os pacientes foram submetidos a um bloqueio anestésico do tipo peribulbar, sendo utilizada uma mistura de lidocaina a 2% e bupivacaina a 0,75% numa proporção de 1:1, com um volume total variando entre 6 a 8 mililitros (ml).

Foi realizada antissepsia com iodopovidona aquosa, na pele na concentração de 10% e na superfície ocular na concentração de 5%. Os cílios foram isolados e um campo estéril foi colocado sobre o paciente.

Após a colocação do blefarostato, foi realizada uma paracentese nasal ou temporal de 0.9mm (dependendo do olho operado), seguido de uma injeção de ar na câmara anterior para retirada do humor aquoso. Foi injetado pela mesma paracentese 0,3ml de AT a 0,1%, (da marca Ophthalmos®, registro Anvisa 10172470012-MS), seguido imediatamente de metilcelulose a 2%, a partir do lado oposto ao do local da incisão na câmara anterior, até o seu preenchimento completo. A incisão principal foi realizada a 90º superior à da paracentese de 3 mm de largura, com três planos, e aproximadamente 1mm de tunelização da córnea. Um a dois ml de hialuronato de sódio na apresentação de 10 miligrama (mg)/ml foram injetados pela incisão principal sobre a cápsula anterior. Em seguida com uma pinça de Utrata (modelo reta) foi realizada a capsulorhexis, com aproximadamente 5 mm de diâmetro na porção central da cápsula anterior do cristalino. Quinze cristalinos não foram corados, porém tiveram o mesmo

processo de coleta, com exceção das etapas da injeção de ar e da injeção do AT na câmara anterior. A escolha do paciente que seria submetido ao uso do AT foi determinada ao acaso durante a sua facectomia, e todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo cirurgião.

Após a capsulorhexis durante o procedimento cirúrgico, as cápsulas coletadas foram imediatamente acondicionadas em frascos do tipo eppendorff de 3ml, com 1,5 a 2ml de fixador para o processo de fixação e posterior análise através da MO de rotina, túnel e imunohistoquímica. Para esta avaliação foram utilizadas 20 amostras fixadas em solução de paraformaldeído a 4%, e distribuídas equitativamente em dois grupos com 10 cápsulas cada, um definido pelo uso do AT (experimental) e o outro não (controle). (Quadro 1)

Foram utilizadas 10 amostras para as análises por meio da MET, com a mesma divisão de grupos em relação ao AT, porém cada grupo com cinco cápsulas (Quadro 1). Nestas avaliações a solução fixadora utilizada era composta de glutaraldeído a 2,5 % e paraformaldeído a 2,0 % em tampão cacodilato de sódio 0,1molar (M), potencial hidrogeniônico (pH) 7,2.

As amostras coletadas foram identificadas nos frascos com marcação por caneta com tinta permanente, além de etiquetadas, para serem entregues no Laboratório de Neurohistologia e Ultraestrutura do Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ.

Quadro 1 - Divisão dos pacientes segundo o uso do azul de tripano com a análise laboratorial realizada

	Controle	Experimental	Total
Microscopia óptica, TUNEL e Imunohistoquímica	10	10	20
Microscopia eletrônica de transmissão	5	5	10
Total	15	15	30

3.3 Análises laboratoriais

No laboratório os espécimes recebidos para análise de MO e imunohistoquímica foram processados para obtenção de blocos de parafina. As amostras foram então desidratadas em concentrações crescentes de etanol, clarificadas em xilol, infiltradas e incluídas em parafina. Secções transversais de 5 μ m de espessura foram obtidas e colocadas em lâminas gelatinizadas e coradas utilizando a técnica da hematoxilina e eosina (HE) para análise em microscopia óptica de rotina e imunohistoquímica. As análises destes espécimes foram realizadas através do microscópio modelo Axioscop 2 plus da marca Zeiss®.

A técnica TUNEL ⁽⁶⁸⁾ foi realizada para evidenciar células em morte celular por apoptose, utilizando o reagente *ApopTag Peroxidase Detection kit* (Chemicon International®). Os cortes foram desparafinizados, hidratados e imersos em tampão citrato pH 6,0 para a realização de processo de recuperação antigênica. A etapa seguinte foi a eliminação da peroxidase

endógena, onde as secções foram incubadas em peróxido de hidrogênio a 3% em solução tampão de fosfato (PBS). Após esta etapa o tampão de equilíbrio foi aplicado sobre as lâminas seguido da aplicação da enzima terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). Em seguida, a solução de lavagem indicada no *Kit* foi aplicada sobre os cortes seguida pelo conjugado anti-digoxigenina. Os cortes foram lavados em PBS e a coloração foi desenvolvida em substrato de peroxidase. Finalmente os cortes foram contra-corados com hematoxilina e observados ao microscópio óptico de campo claro. Os núcleos corados de marrom indicaram a fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA), sugerindo apoptose.

A eficácia da reação no complexo cápsula - ESC foi confirmada por meio de um controle positivo e negativo utilizando os mesmos reagentes em testículos de rato (controle positivo) e secções do ESC omitindo a digoxigenina (controle negativo).

Outra via de morte celular pesquisada foi a da autofagia ⁽⁶⁹⁾, investigada pela técnica imunohistotoquímica com marcação de anticorpos para beclina-1. As lâminas foram banhadas três vezes no xilol por 5 min cada. Logo em seguida passaram por dois banhos de etanol 100% por 10 min cada e dois banhos de etanol a 95% por 10 min cada. Depois foram mergulhadas duas vezes em água destilada por 5 min cada e colocadas numa solução de citrato de sódio 10 ml e pH 6,0. Então estas lâminas foram ainda mergulhadas no citrato de sódio, levadas ao microondas por 2 min com potência 10. Em seguida estas lâminas foram resfriadas por 30 min em

uma bancada, banhadas três vezes em água destilada por 5 min e em PBS por 5 min.

O bloqueio de antígenos não específicos foi feito em solução de albumina bovina a 5% em PBS/triton por 60 min. Coloca-se o anticorpo primário (1:100, *anti beclina Cell Signaling Technology*®), que foi deixado numa câmara úmida com cerca de 4 graus celsius(°C) durante a noite.

No dia seguinte as lâminas foram lavadas três vezes em PBS por 5 min cada e incubadas no anticorpo secundário (CY3) em PBS/triton por duas horas (hs) no escuro e em temperatura ambiente. Após esta pausa, as lâminas foram lavadas em *high salt* (0,4M) PBS por três vezes de 5 min cada. A seguir as lâminas foram montadas no escuro e finalmente examinadas no MO com filtros monocromáticos específicos para fluorescência. A presença de marcação fluorescente no ESC indica positividade da reação e que há morte celular por autofagia.

Na observação das amostras por MET convencional do material proveniente dos cristalinos fixados, descrito anteriormente, foi clivado em 1 mm e colocado numa solução de glutaraldeído a 2,5 % e paraformaldeído a 2,0 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, durante um período de duas horas para fixação. O material foi então lavado em tampão cacodilato de sódio e pós-fixado por 1h em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato mais ferricianeto de potássio a 1% e cloreto de cálcio (CaCl₂) a 5 milimolar (mM). Em seguida, o material foi novamente lavado em tampão cacodilato de sódio e contrastado em bloco com acetato de uranila a 1% em

água durante a noite. Posteriormente, ele foi desidratado por uma série de soluções de acetona em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e 100%), impregnado e incluído em resina Polybed 812 (figura 2A). Além dos cortes semifinos 500µm, cortes ultrafinos de 50 a 70 nanômetros (nm) foram obtidos com o ultramicrotomo modelo MT 6000 XL-RMC da marca Reichert® (figura 3A). Todos os cortes foram transversais e contrastados com solução de acetato de uranila durante 15 min e citrato de chumbo por 5 min. Após sua montagem em grades específicas (figura 2B), foram examinados no MET modelo EM 900 da marca Zeiss ® (figura 3B), operado numa voltagem de 80 kilovolts (kV).

Figura 2 - Demonstrando o processamento laboratorial das amostras para observação por MET. A - Material biológico incluído em bloco de resina Polyeb 812, necessário para o corte no ultramicrotomo. B - Grades para montagem das amostras já cortadas e contrastadas que serão colocadas no Microscópio eletrônico.

Figura 3 - Aparelhos utilizados no estudo necessários para observação e corte das amostras respectivamente. A - Microscópio eletrônico de transmissão modelo EM 900 da marca Zeiss ®. B - Ultramicrotomo modelo MT 6000 XL-RMC da marca Reichert ®.

Também foi feita uma análise quantitativa por meio de morfometria celular, das imagens microscópicas de ambos os grupos (controle e experimental). Foram feitas cinco fotomicrografias de cada amostra coletada por paciente, e inseridas no programa Digital Image Pro Plus, Cybernetics ®, United States of America (USA).

As imagens das lamínas na MO foram captadas utilizando uma câmera digital (Zeiss®) do próprio aparelho, que conectada a um microcomputador fez a inserção diretamente no programa de análise das imagens. As medidas foram feitas em relação à espessura isolada da cápsula, do epitélio do cristalino e de todo complexo cápsula - ESC. Os

limites entre o perfil celular do epitélio e da cápsula anterior do cristalino foram determinados, calculando as suas dimensões (figura 4A).

Também foram realizadas medidas nas micrografias eletrônicas do ESC, considerando a distância entre os dois maiores eixos nucleares perpendiculares, e a relação entre o perímetro nuclear total sobre a sua área (figura 4B). Na MET por não haver captura digital das imagens, as micrografias foram registradas em forma de filme convencional e após a revelação foram digitalizadas para sua inserção no programa Image Pro Plus.

Figura 4 - Marcações celulares para as medidas morfométricas. A - As linhas amarelas demarcam os perfis das bordas celulares do ESC e da cápsula, enquanto que as linhas vermelhas indicam as suas espessuras. B - As linhas verdes demarcam os perfis das bordas celular e nuclear. A cor azul indica a área nuclear e a linha vermelha à espessura celular. As linhas amarelas marcam as distâncias nos maiores eixos nucleares perpendiculares

3.4 Análise estatística

Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software *Inc.*, San Diego, Califórnia, *USA*). A homogeneidade entre proporções dos dois grupos (controle e experimental) foi feita pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney na variável da idade, e pelo teste do qui-quadrado nas demais. As variáveis foram analisadas descritivamente em relação aos valores mínimo e máximo, médias, medianas e desvio-padrão, com o cálculo do intervalo de confiança (IC) a 95%. A comparação das medidas morfológicas entre os dois grupos também foi feita pelo teste de Mann-Whitney e o nível de significância utilizado foi de 0,05 ($\alpha = 5\%$).

---

4 RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 30 amostras de cápsulas com o ESC, sendo 15 no grupo experimental e 15 no grupo controle. A idade média dos pacientes foi de 71,83 anos. Quatorze (47%) eram do sexo masculino e 16 (53%) do feminino.

A distribuição dos pacientes em relação à idade e os tipos de análises laboratoriais realizadas está apresentada nas tabelas 1, 2 e 3. Não houve diferença estatística significativa entre a homogeneidade dos grupos em relação as variáveis testadas.

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes segundo idade (anos)

Grupo	n	Média	DP
Controle	15	72,80	3,321
Experimental	15	70,87	7,308

Nota: n = número da amostra; DP = desvio-padrão
P= 0,31, teste de Mann-Whitney.

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes segundo a análise laboratorial realizada

Grupo	Controle		Experimental		Total
	n	%	n	%	
MO	10	67	10	67	20
MET	5	33	5	33	10
Total	15	100	15	100	30

Nota: n = número da amostra; % = porcentagem; MO = microscopia óptica; MET = microscopia eletrônica de transmissão.
p=1,000, teste do qui-quadrado.

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes segundo a análise laboratorial realizada por meio da MO

Grupo	Controle		Experimental		Total
	N	%	n	%	
HE e Tunel *	5	50	5	50	10
Beclina	5	50	5	50	10
Total	10	100	10	100	20

Nota: n = número da amostra; % = porcentagem; MO = microscopia óptica; HE = hematoxilina e eosina
p=1,000, teste do qui-quadrado.

(*) Estas amostras (dos mesmos pacientes) foram analisadas qualitativamente tanto pela técnica de HE quanto TUNEL.

As análises referentes à morfologia da cápsula e do ESC por meio de MO com coloração pela HE, não mostraram diferenças entre os grupos controle e experimental. Em ambos os casos a cápsula se mostrou corada de forma homogênea, com seus limites precisos tanto nas suas faces humoral quanto lenticular. O ESC se apresentou com uma única camada de células, em formação regular, aderidas tanto nos seus domínios basais quanto laterais (figura 5A e B).

Figura 5 - Lâminas para MO coradas por HE nos grupos controle (A) e experimental (B). Observa-se a cápsula (asterisco - *) e os seus limites humoral (setas pretas - ➡) e lenticular (setas brancas - ➡). O ESC (estrela - +) está aderido em toda extensão a cápsula adjacente. Imagens com magnificação de 400 vezes (x).

A técnica TUNEL também analisada pela MO marcou os núcleos celulares dos epitélios submetidos ao AT, indicando fragmentação do DNA e expressão de morte celular por apoptose (figura 6). Nas amostras do grupo controle não foram observadas marcações nucleares (figura 7). Os testes com os cortes histológicos de testículo de rato, demonstraram no controle positivo a presença da expressão de apoptose (figura 8B). O controle negativo foi feito sem o tratamento com TdT e, portanto, não houve marcação, confirmando a eficácia da reação utilizada (figura 8A).

Figura 6 - Lâmina em que foi feita a técnica TUNEL no grupo de amostras coradas com AT. Encontramos os núcleos celulares bem individualizados marcados em coloração mais escura, tons marrons (setas brancas - ⇒), indicando presença de morte celular por apoptose

Figura 7 - Lâmina em que foi feita técnica TUNEL no grupo controle. Não foi confirmado apoptose celular por não ter sido observada marcação nuclear decorrente da reação

Figura 8 - Lâminas dos testículos de ratos para o controle da reação de TUNEL. A - Controle negativo demonstrando que não há marcação nuclear, devido a reação incompleta sem adição da enzima TdT. B - Controle positivo demonstrando a presença de marcação nuclear (setas pretas - →) e expressão de apoptose

Nas análises imunohistoquímicas feitas com os anticorpos para beclina-1, foram observadas alterações entre os dois grupos estudados. A marcação fluorescente, que indica positividade da reação, foi encontrada em todas as amostras submetidas ao AT (figura 9B), indicando expressão de morte celular por autofagia. Em contraste o grupo controle não apresentou nenhuma marcação (figura 9A).

Figura 9 - Lâminas observadas na MO com filtros de fluorescência para análise de morte celular por autofagia. A - Não há marcação epitelial no grupo controle. Escala de 20μm. B - No grupo de amostras submetidas ao AT há marcação positiva (setas brancas - ⇒) para o anticorpo beclina-1 e expressão de autofagia. Escala de 10μm

A MET feita nas células do ESC demonstrou aspectos morfológicos diferentes entre o grupo controle (figura 10A e B) e o grupo corado com AT a 0,1% (figuras 11A e B). As amostras coradas com AT apresentavam células com citoplasma mais elétron denso, mais mitocôndrias, dilatações e rupturas do retículo endoplasmático e das mitocôndrias, além de um perfil nuclear irregular com tamanho aumentado. As amostras que não foram expostas ao AT apresentavam o citoplasma elétron-lucente, o núcleo eucromático com perfil regular e tamanho menor.

Figura 10 - Elétron-micrografias da cápsula e das células do epitélio subcapsular cristaliniano que não foram expostos ao AT. A - Observa-se a cápsula (círculo preto), o citoplasma elétron-lucente (círculos brancos) e o núcleo eucromático (estrela). Aumento de 12.000x com escala de 3 μ m. B - Mitocôndrias com padrão morfológico normal demonstrado pelas cristas externas (setas brancas - $\Rightarrow$) e cristas internas (setas pretas - $\blacktriangleright$). Aumento de 20.000x com escala de 1,1 μ m

Figura 11 - Elétron-micrografias da cápsula e das células do ESC que foram submetidos ao AT. A - Observa-se irregularidade no limite nuclear (setas pretas ->), modificação no padrão das organelas citoplasmáticas com rupturas nos perfis mitocondriais (setas brancas ->). Aumento de 12.000x, com escala de 3 μ m. B - Nota-se aumento da eletron-densidade citoplasmática e desorganização nas cristas mitocondriais (seta branca ->). Aumento de 40.000x com escala de 0.43 μ m

A morfometria foi feita na MO incluindo amostras de 5 indivíduos para o grupo controle e 5 para o grupo experimental. O cálculo morfométrico foi feito pela média de 5 medidas diferentes por amostra coletada para cada parâmetro analisado. As medidas para a espessura da cápsula, do epitélio subcapsular e do conjunto destas estruturas não demonstraram diferença estatística significativa, apresentando $p=0,22$ calculado pelo teste de Mann-Whitney. O intervalo de confiança a 95% foi de 7,22 a 12,72 para o grupo controle, e de 5,92 a 10,00 para o grupo experimental. (Gráfico 1 e tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição dos valores da espessura (μm) da cápsula e do epitélio subcapsular cristalino nos grupos controle e experimental

Grupo	Média	DP	Mínimo	Máximo	Mediana	IC(95%)
Controle	9,97	2,22	7,46	12,78	10,44	7,21 a 12,72
Experimental	7,96	1,64	6,04	9,64	8,80	5,92 a 10,00

Nota: DP = desvio padrão; μm = micrômetro; IC(95%) = intervalo de confiança a 95%.
 $p=0,22$, teste de Mann-Whitney.

Gráfico 1 - Modelo *box plot* demonstrando a distribuição dos valores da espessura (μm) da cápsula e do epitélio subcapsular cristalino nos grupos controle e experimental

A morfometria na ME mostrou diferentes valores para as aferições obtidas entre os grupos estudados. Também foram incluídas amostras de 5 indivíduos para cada grupo, e novamente foi analisado a média de 5 medidas por parâmetro.

As medidas em relação ao perímetro - área nuclear no grupo controle foram de $0,91 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ para o maior valor, de $0,65 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ para o menor, com uma média de $0,80 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ($\pm 0,10$ DP). Para o mesmo parâmetro no grupo submetido ao AT, o maior valor foi de $1,59 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ e o menor de $0,85 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$, com uma média de $1,31 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ($\pm 0,29$ DP). A análise estatística realizada pelo teste de Mann-Whitney demonstrou uma diferença significativa com valor de $p=0,03$. O intervalo de confiança a 95% foi de 0,67 a 0,94 para o grupo controle, e de 0,96 a 1,68 para o grupo experimental (gráfico 2 e tabela 5).

A relação dos eixos nucleares também variou entre os grupos, no grupo controle o valor maior e menor foram $2,01\mu\text{m}$ e $1,54\mu\text{m}$ respectivamente, e a média $1,76\mu\text{m}$ ($\pm 0,18$ DP). No outro grupo submetido ao AT a maior medida foi de $3,78\mu\text{m}$ e a menor de $1,85\mu\text{m}$, com uma média de $2,97\mu\text{m}$ ($\pm 0,70$). O teste de Mann-Whitney demonstrou uma diferença estatística significativa também com um valor de $p=0,03$. O intervalo de confiança a 95% para o grupo controle foi de 1,54 a 2,00, e do grupo experimental de 2,10 a 3,85 (gráfico 3 e tabela 6).

Tabela 5 - Distribuição dos valores na relação perímetro área ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$) do núcleo no ESC entre grupos controle e experimental

Grupo	Média	DP	Mínimo	Máximo	Mediana	IC(95%)
Controle	0,81	0,11	0,65	0,91	0,86	0,67 a 0,94
Experimental	1,32	0,29	0,86	1,59	1,46	0,96 a 1,68

Nota: DP = desvio padrão; $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ = micrômetro por micrômetro quadrado; IC(95%) = intervalo de confiança a 95%.
p=0,03, teste de Mann-Whitney

Gráfico 2 - Modelo *box plot* demonstrando a distribuição dos valores na relação perímetro área ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$) do núcleo no ESC entre grupos controle e experimental

Tabela 6 - Distribuição dos valores na relação dos maiores eixo nucleares perpendiculares (μm) no ESC entre grupos controle e experimental

Grupo	Média	DP	Mínimo	Máximo	Mediana	IC(95%)
Controle	1,77	0,18	1,54	2,01	1,78	1,54 a 2,00
Experimental	2,98	0,70	1,85	3,79	3,08	2,10 a 3,85.

Nota: DP = desvio padrão; μm = micrômetro; IC(95%) = intervalo de confiança a 95%.
 $p=0,03$, teste de Mann-Whitney.

Gráfico 3 - Modelo *box plot* demonstrando a distribuição dos valores na relação dos maiores eixos nucleares perpendiculares (μm) no ESC entre grupos controle e experimental

---

5 DISCUSSÃO

O AT é um corante vital do tipo ácido aniônico ⁽⁷⁰⁾ que possui comprovada segurança no seu uso intra-operatório, quanto à toxicidade no segmento anterior ^(71,72). No entanto quando sua exposição é mais prolongada durante a cirurgia ou quando o corante atinge o segmento posterior do olho ele pode ser tóxico ^(57,71).

A avaliação pela microscopia eletrônica de transmissão, dos efeitos do AT sobre a cápsula anterior de cristalinos humanos foi realizada por Rangaraj e colaboradores (cols.) ⁽⁶²⁾, numa análise de duas amostras. Nesse estudo o autor demonstrou que a cápsula corada apresentava o limite externo rasgado e irregular, assim como presença de alterações descritas como “bolhas” no seu interior. Já demonstramos em trabalhos anteriores ⁽⁶³⁾ e neste estudo, que não encontramos as alterações descritas, não havendo diferença ultraestrutural entre as cápsulas do grupo controle e do grupo corado. A diferença dos resultados nos dois estudos pode ter sido ocasionada pela grande variabilidade de fatores existentes neste tipo de estudo (tipo de técnica cirúrgica, tipo de catarata, tipo de análise, número de amostras).

Em outro estudo, realizado em 2003, Singh e cols., ⁽⁶⁴⁾ analisaram 10 amostras da cápsula anterior obtidas a partir da CCC em cristalinos de pacientes que utilizaram o AT numa concentração de 0,6mg/ml ⁽⁶⁴⁾. As amostras foram analisadas por MO e imunohistoquímica (para colágeno IV),

e o que se observou foi que o AT atinge a sua maior concentração na lâmina basal das células epiteliais poupando a região cortical. O epitélio não foi claramente identificado nos cortes realizados. No presente estudo também não foram observadas alterações estruturais na cápsula ou nas células do ESC quando a análise foi realizada com a MO; entretanto, pela MET, demonstramos que o AT foi tóxico para as células epiteliais, reproduzindo nossos resultados prévios ⁽⁶³⁾, apesar de não se determinar ainda como sua ação ocorre. Os resultados apresentados por Singh ⁽⁶⁴⁾ demonstram uma maior concentração do AT na face lenticular da membrana basal, superfície de interface com o domínio basal do ESC, importante e muito ativo no metabolismo celular. Modificações locais poderiam alterar a fisiologia molecular modificando vias de sinalização (ex. integrinas, receptores quinase) e induzir o resultado tóxico observado.

O estudo de Nanavaty e cols ⁽⁶⁵⁾ numa amostra de 40 pacientes mostra que o AT afeta tanto a densidade quanto a viabilidade das células do ESC, indicando também alguma toxicidade.

Wollensak e cols ⁽⁵⁹⁾ demonstraram num estudo comparativo a mensuração da tensão em 55 cápsulas cristalínias de olhos de porcos coradas com AT. As cápsulas foram submetidas a uma iluminação por pelo menos 1 minuto no ato cirúrgico, tiveram um endurecimento capsular com diminuição da elasticidade. Atribuiu-se este fato a uma fotossensibilização com aumento nas ligações das fibras colágenas. O artigo de Dick e cols ⁽⁶⁰⁾ descreve os mesmos resultados, sendo melhor caracterizado pelo uso de

amostras de facectomias em seres humanos, entretanto ambos se referem à capacidade que o AT tem em modificar a biomecânica da membrana basal sem análise histológica. Recentemente, Jardeleza e cols ⁽⁶¹⁾ também demonstraram que se a cápsula cristalínea já é suscetível a esse tipo de modificação como no caso de pacientes diabéticos, a sua rigidez induzida pelo uso do AT é ainda mais acentuada. Todos estes resultados reforçam a possibilidade das alterações encontradas no ESC induzidas pelo uso do AT, possam ter origem também na própria MEC.

Demonstramos que o efeito tóxico do AT no ESC altera a sua morfologia desencadeando duas vias de morte celular, uma por apoptose e outra por autofagia. Apesar da descrição de apoptose já ter sido feita no ESC em cataratas sem a utilização do AT ^(73, 74), o nosso estudo demonstra por meio de uma diferença significativa entre os grupos analisados, a sua influência em causar ou acelerar a morte celular nesse processo. O TUNEL é uma técnica que detecta a fragmentação do DNA e é realizado principalmente para identificar a morte celular por apoptose, porém, sabe-se que esta fragmentação pode aparecer também nas vias de morte celular por necrose e autofagia ⁽⁷⁴⁾. A análise combinada do TUNEL com as características celulares encontradas na MET não deixam dúvidas quanto à presença de apoptose.

Em relação à via de autofagia, não encontramos na literatura qualquer estudo que tenha sido realizado no ESC com ou sem a presença do AT. Foi demonstrado que não há autofagia no grupo controle, e apesar do número

da amostra ser pequeno, pode ser uma via que normalmente não se expressa no cristalino em condições normais. A imunohistoquímica realizada é específica para esta via molecular ⁽⁶⁹⁾, e a sua presença no grupo experimental demonstra que houve uma resposta tóxica relacionada ao uso do corante.

A toxicidade do AT no ESC, por outro lado, pode ser benéfica se aproveitada para evitar a proliferação, migração e diferenciação das células epiteliais remanescentes do saco capsular no pós-operatório de facectomias. Portanto é possível que o seu uso possa interferir tanto no desenvolvimento da OCP quanto na síndrome de contração capsular ^(75,76), prevenindo ou reduzindo as suas incidências.

Em ambos os casos são estas células remanescentes que após a modificação do meio induzido pelo trauma cirúrgico, sofrem alterações morfológicas, produzem colágeno tipo I, III, IV além de fibronectina e formam tecidos fibrosos que resultam na piora da qualidade visual do paciente ^(77,78).

O nosso estudo foi desenvolvido na porção central da cápsula anterior, mas sabemos que a zona germinativa, principal local de divisão celular do ESC, está localizado na região equatorial e também tem importância na OCP. Portanto, se o AT for utilizado no sentido de prevenir ou reduzir a OCP, torna-se fundamental o desenvolvimento de novas estratégias cirúrgicas para que o AT atinja da certa forma esta região.

Por ser uma complicação que sofre influência de vários fatores, diversos mecanismos para prevenção e redução da OCP têm sido

---

estudados. Neste espectro se incluem manobras cirúrgicas específicas, desenvolvimento de novos materiais e formatos de LIOs, utilização de fármacos específicos ⁽⁷⁸⁾. O AT utilizado com esta finalidade parece ter boas perspectivas e pode se tornar mais uma opção de terapia adjunta para evitar a OCP.

A correlação entre as alterações histológicas com as características clínicas e biomecânicas ainda não estão bem estabelecidas, sendo importante a realização de novos estudos com um maior número de amostras e diferentes formas de análises laboratoriais para dar continuidade a esta linha de pesquisa e determinar melhor os efeitos do AT na cápsula e no ESC.

---

6 CONCLUSÕES

---

1. O AT a 0,1% não causou alteração estrutural ou ultraestrutural em nenhuma das cápsulas anteriores analisadas, não causando diferenças morfológicas entre os grupos controle e o experimental.
2. O ESC não expôs diferenças estruturais com a utilização do AT 0,1%, entretanto a ultraestrutura se modificou intensamente apresentando sinais de toxicidade celular.
3. O AT a 0,1% provoca toxicidade no ESC causando alterações celulares indicativas de morte celular com indução molecular tanto pela via de apoptose quanto de autofagia.
4. A morfometria celular quantificou e demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre a morfologia dos grupos estudados, corroborando o efeito tóxico do AT a 0,1% no ESC.

---

7 ANEXOS

7.1 Anexo A

Carta de aprovação do estudo pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade da São Paulo (USP) .

Ao

Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 21.02.08, tomou ciência da execução do Protocolo de Pesquisa nº 0048/08, intitulado: "ANÁLISE DO AZUL DO TRIPANO A 0,1% NA CÁPSULA ANTERIOR E NAS CÉLULAS DO EPITÉLIO DO CRISTALINO: ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO E ULTRAESTRUTURAL".

No que tange sua parte empírica será desenvolvido no HOSPITAL GERAL DE BONSUCESSO-RJ, tendo seu Comitê de Ética aprovado o estudo em 16.04.07.

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. MÁRIO LUIZ RIBEIRO MONTEIRO**

Pesquisador (a) Executante: **DR. ANDRÉ LUÍS FREIRE PORTES**

CAPPesq, 21 de fevereiro de 2008.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

7.2 Anexo B

Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral de Bonsucesso (HGB) no Rio de Janeiro.

 MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral de Bonsucesso PARECER DO PROJETO DE PESQUISA / CEP-HGB 45/06	
Coordenadora: Sonia Paredes de Oliveira (Médica). Vice Coordenadora: Antonio Abílio P. Santa Rosa (Médico). Secretária Executiva: Cristina Carvalho V. de Araújo (Enfermeira) Membros Carlos Roberto Cabral (Representante dos Usuários) Giuseppe Santa Lucia (Médico) Gustavo Antonio S. Nogueira (Assistente Social) Lia Cristina Galvão dos Santos (Enfermeira) Marcia Natal Batista Abreu (Psicóloga) Marcos Andrade Silva (Enfermeiro) Maria Elisa Ferrão (Nutricionista) Virgínia Ribeiro Lima e Andrade (Enfermeira) Projeto: Análise do azul do tripano a 0,1% na cápsula anterior e nas células do Epitélio do cristalino: estudo mineral, imunohistoquímico e ultraestrutural. Autor: André Luís Freire Portes	Rio de Janeiro, 16 de abril de 2007. O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral de Bonsucesso, após avaliação, considerou o projeto (CEP-HGB 45/06) aprovado, encontrando-se dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução nº 196 de outubro de 1996 que dispõe sobre a pesquisa envolvendo seres humanos. Informamos a necessidade de que no mês de junho de 2007 seja encaminhado a este CEP um relatório com os dados parciais da pesquisa. Solicitamos que ao término da mesma, seja encaminhada a esta Comissão uma cópia eletrônica (CD-R) do Relatório Final da Pesquisa. Profª Drª Sonia Paredes de Oliveira Coordenadora do CEP-HGB

7.3 Anexo C

Artigo publicado no periódico *Journal of Cataract & Refractive Surgery* com dados parciais da tese. Referência: J Cataract Refract Surg. 2007 Jun;33(6):1135-6.

HONDENRE

1135

1136

COX AND SPENCER

Effect of trypan blue on lens epithelial cells in human eyes having capsulorhexis

André Luís F. Fortes, MD,
Mário L.R. Martins, MD, PhD,
Steno Alodi, PhD, Nádja C.O. Migue/MSc, PhD

Trypan blue dye is widely used to facilitate capsulorhexis in cataract surgery.^{1,2} Several studies show that trypan blue (0.1%) efficiently stains the anterior capsule without being toxic to the anterior segment of the eye. However, other studies show that in cases with extended surgery or contact between trypan blue and the posterior segment of the eye, ocular structures may be damaged.³ Furthermore, the density and viability of lens epithelial cells (LECs) are affected by the use of trypan blue.⁴ We wondered whether the use of trypan blue (0.1%) could reduce the proliferation of LECs and thereby help prevent posterior capsule opacification (PCO). We designed an electron microscopic study to evaluate the effect of trypan blue on LECs.

Approval for the prospective study was obtained from an institutional review board ethics committee. The mean age of the 10 patients was 65 years; no patient had diabetes, glaucoma, or inflammatory eye disease. Phacemulsification for posterior subcapsular cataract was performed in all patients. Capsulorhexis was done with a Ultra forceps; samples of approximately 5.0 mm from the central portion of the anterior capsule were collected. In 5 patients (treatment group), capsulorhexis was performed after the capsule was stained with trypan blue (0.1%); this was followed by injection of an ophthalmic viscosurgical device. In 5 others (control group), capsulorhexis was performed without trypan blue staining.

Samples were immediately immersed in sodium cacodylate buffer containing glutaraldehyde 2.5% and paraformaldehyde 4%. After pre-electron microscopy processing, the material was embedded in Epon in the laboratory. Ultrathin sections were obtained and stained with uranyl acetate and lead citrate and observed under a Zeiss 900 transmission electron microscope.

Two epithelial cell types were observed in samples from both groups, 1 with a more electron-dense cytoplasm and apparently more mitochondrial profiles than the other. All cells were well preserved, with euchromatic nuclei and intact organelles. However, abnormalities were found in both cell types in the samples stained with trypan blue. The nuclear envelope profile of the cells was irregular compared with that of the cells in the controls and the mitochondria were disrupted, with no viable cristae. In addition, increased electron density in the cytoplasm of the

Figure 1. Electron micrographs of human lenses not exposed to trypan blue (A) and of those stained with trypan blue (0.1%) (B, C, D). A: Three LECs from a control sample. Note the euchromatic nucleus of 1 of the 3 cell types, with a more electron-dense cytoplasm than the electron-lucent neighbor cells (*) (bar = 1 μ m). B: Two epithelial cells from an unexposed lens. Note the electron-lucent cytoplasm in 1 (*), with well-preserved mitochondrial profiles (arrows) and an electron-dense cell (arrowhead) (bar = 1 μ m). C: One trypan-blue-stained electron-lucent epithelial cell and 3 surrounding parts of 1 or more electron-dense epithelial cells (arrowheads). Note the irregular nuclear envelope profile of the electron-lucent cell and the disrupted mitochondria (bar = 1 μ m). D: Two epithelial cells, 1 electron lucent (*) and 1 electron dense (arrowhead). Note the increased electron density of the cytoplasm of the electron-dense cell, as well as the disrupted mitochondria and endoplasmic reticulum (arrows) (bar = 1 μ m).

electron-dense cell type and disrupted endoplasmic reticulum in both cell types were observed in the trypan-blue-stained samples (Figure 1).

Our findings indicate that trypan blue can induce subcellular changes in LECs of human eyes having capsulorhexis. Although we cannot rule out that some of the changes are age associated,⁵ the striking differences between the treatment group and the control group indicate that they must be primarily related to the use of trypan blue and suggest that cell death may occur in LECs of human eyes having capsulorhexis subsequent to treatment with trypan blue. Since viability of LECs is important in PCO, our findings lend support to the hypothesis that the use of trypan blue (0.1%) may reduce the incidence of PCO after cataract surgery.

REFERENCES

1. Mehta GR, de Waard RW, Pameyer JH, Baskin WH. Trypan blue capsule staining to visualize the capsulorhexis in cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 1999; 25:7-9.
2. Gada T, Ray M, Bhartiya P, Vajpayee RB. Trypan-blue-assisted capsulorhexis for traumatic phacemulsification surgery [letter]. *J Cataract Refract Surg* 2002; 28:575-576.
3. Jacobs DS, Cox TA, Wagoner MD, et al. Capsule staining as an adjunct to cataract surgery: a report from the American Academy

of Ophthalmology (Ophthalmic Technology Assessment). *Ophthalmology* 2000; 112:707-710.

4. Narasany MA, Jorja K, Srinivasan MA, et al. Effect of trypan blue staining on the density and viability of lens epithelial cells in white cataract. *J Cataract Refract Surg* 2000; 26:1482-1488.
5. Chankidev A, Kaddipati A, Tallimbari M, et al. Lens epithelial apoptosis and cell proliferation in human age-related cataract. *Surv Ophthalmol* 2005; 50:210-220.

Intermittent corneal edema due to anterior segment retained lens fragments

Almet T. Yazici, MD, Vedat Kaya, MD,
Erument Buhari, MD, Serhat Inanoglu, MD,
Omer F. Yilmaz, MD

In uneventful phacemulsification, lens fragments may move between the iris and may not be visible after the procedure.¹ Although many studies look at retained lens fragments in the vitreous,^{2,3} only a few consider anterior segment residues.^{4,5}

CASE REPORT

A 67-year-old woman had had phacemulsification and intraocular lens (IOL) implantation 3 years previously. Six weeks postoperatively, she presented to an

7.4 Anexo D

Trabalho científico apresentado no XXXIV Congresso Brasileiro de Oftalmologia em Brasília, com novos dados complementares numa segunda etapa da linha de pesquisa. Apresentação em forma de tema livre e agraciado com o Prêmio Pesquisa Básica. Referência: Arq Bras Oftalmol. 2007;70(4 supl):23.

Resumos dos Temas Livres do XXXIV Congresso Brasileiro de Oftalmologia

TL 055

ANÁLISE MORFOMÉTRICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DO EPITÉLIO SUBCAPSULAR DE CRISTALINOS CORADOS COM AZUL DE TRIPANO 0,1%

André Luís Freire Portes, Mario Luiz Ribeiro Monteiro, Abelardo Couto Junior, Silvana Allodi, Nádia Campos Oliveira Miguel

Universidade de São Paulo – SP/ Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ / Hospital Geral de Bonsucesso – RJ

Objetivos: Analisar a morfometria da ultra-estrutura do epitélio subcapsular do cristalino (ESC) por microscopia eletrônica de transmissão, em pacientes que se submeteram a capsulotomia curvilínea contínua (CCC) utilizando o corante azul de tripano (AT) a 0,1%. **Métodos:** Estudo prospectivo controlado, randomizado e mascarado, composto de 10 amostras obtidas após CCC. As amostras foram divididas em 2 grupos com 5 espécimes cada, sendo um submetido ao AT. Após análise das amostras por microscopia eletrônica de transmissão, 3 eletromicrografias foram feitas de cada paciente para análise da espessura mínima (μm) e da relação perimetrolárea do núcleo celular ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$). **Resultados:** Observou-se alterações em algumas células do ESC coradas com o AT, ruptura mitocondrial, aumento da eletro-densidade citoplasmática e nuclear, retículo endoplasmático dilatado e irregularidade no perfil nuclear. A morfometria foi realizada com o programa Image Pro Plus (Cybermetrics® USA), e os valores obtidos nos 2 grupos analisados e comparados pelo teste estatístico de Mann-Whitney. Em ambas as análises se encontrou uma diferença estatística importante entre os grupos, tanto na relação nuclear da perimetrolárea com um valor de $P=0,0317$, quanto na espessura mínima $P=0,0079$. **Conclusão:** As alterações celulares encontradas no ESC das amostras coradas com AT são indicativas de morte celular. A diferença estatística entre os grupos mostra um efeito tóxico direto do AT nessas células. A utilização do AT para diminuir a proliferação das células ESC no pós-operatório das facotomias com a finalidade de prevenir a opacificação da cápsula posterior deve ser considerada, no entanto novos estudos são necessários para se determinar melhor essa relação.

Prêmio Pesquisa Básica

Título: Análise morfométrica por microscopia eletrônica de transmissão do epitélio subcapsular de cristalinos corados com azul de tripano 0,1%

Autores: André Luís Freire Portes, Mario Luiz Ribeiro Monteiro, Abelardo Couto Junior, Silvana Allodi, Nádia Campos Oliveira Miguel

Instituição: Universidade de São Paulo/ Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Hospital Geral de Bonsucesso - Rio de Janeiro - RJ

7.5 Anexo E

Trabalho científico apresentado em 2008 no 51º Congresso Português de Oftalmologia, na cidade do Porto em Portugal, numa 3ª etapa da linha de pesquisa. Apresentação em forma de tema livre.

JORNADAS DE INVESTIGAÇÃO

COMUNICAÇÕES LIVRES

Mesa: Paulo Torres

J. Salgado Borges, Carlos Marques Neves

Sala Porto

- JI 01**
16.30h
MODULAÇÃO NEURO-HUMORAL DA CONTRACÇÃO DO ESFÍNCTER DA ÍRIS PELA UROCORTINA E KISSPEPTIN
Ana Fonseca¹, Marta Ramos-Tavares², Joana Saraiva², F. Falcão-Reis¹, Amândio Rocha-Sousa¹
(1- Serviço Oftalmologia - Faculdade de Medicina Universidade do Porto/ Hospital S. João, 2- Serviço de Fisiologia - Faculdade de Medicina Universidade do Porto)
- JI 02**
16.40h
NÍVEIS DE VEGF SÉRICO EM DOENTES SUBMETIDOS A TERAPIA INTRAVÍTREA COM BEVACIZUMAB
Ângela Carneiro¹, Manuel Falcão¹, Raquel Costa², Raquel Soares², Fernando Falcão-Reis^{1,2}
(1-Hospital São João, 2-Faculdade de Medicina Universidade do Porto)
- JI 03**
16.50h
MTI PHOTOSCREENER VERSUS PLUSOPTIX
Ana Monteiro, J. Coimbra de Matos, Sandra Gouveia, Raquel Leitão, Patrícia Neves, Libânia Dias
(Hospital de São Sebastião)
- JI 04**
17.00h
ESTRUTURA E FUNÇÃO NA DOENÇA DE STARGARDT
Nuno Gomes¹, Vivienne C. Greenstein², Joshua N. Carlson², Stephen H. Tsang³, R. Theodore Smith³, Ronald E. Carr², Stanley Chang³
(1-Hospital de São João, Porto, Portugal, 2-Department of Ophthalmology, NYU School of Medicine, New York, NY, 3-Department of Ophthalmology, Columbia University, New York, NY)
- JI 05**
17.10h
AVALIAÇÃO DA RETINA PRÉ E PÓS CIRURGIA POR D.R.R. COM MÁCULA ON COM 3D-OCT-1000
Nuno Lopes, Isabel Sampaio, Bernardete Pessoa, Natália Ferreira, Angelina Meireles
(Hospital Geral de Santo António - Centro Hospitalar do Porto)
- JI 06**
17.20h
AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO TRATAMENTO CIRÚRGICO DE MEMBRANAS EPIRETINIANAS IDIOPÁTICAS: UM ESTUDO DE "FOLLOW-UP"
Aldina Reis^{1,2}, António Travassos^{2,3}, Ilídio Faria³, Robert van Velze³, Joana Sampaio¹, Armanda Santos², Edgar Ferreira², Miguel Castelo-Branco^{1,2}
(1-NeuroEye, 2-BlueWorks, Coimbra, 3-Centro Cirúrgico de Coimbra)
- JI 07**
17.30h
AVALIAÇÃO DA TENSÃO INTRA-OCULAR APÓS VITRECTOMIA E TAMPONAMENTO COM GÁS POR DESCOLAMENTO DE RETINA REGMATOGENEO
Natália Ferreira, Miguel Gomes, Nuno Correia, Angelina Meireles
(Hospital Geral de Santo António)
- JI 08**
17.40h
VIAS DE MORTE CELULAR NO EPITÉLIO SUBCAPSULAR CRISTALINIANO INDUZIDAS PELO USO DO AZUL DE TRIPANO INTRA-OPERATÓRIO
André Luís Freire Portes, Mário Luiz Ribeiro Monteiro, Nadia Campos de Oliveira Miguel
(Universidade de São Paulo)

7.6 Anexo F

Trabalho científico apresentado em 2009, no 7º Congresso Internacional da Sociedade Italiana de Oftalmologia, na cidade de Roma na Itália, como apresentação oral no Símpósio Brasil–Itália de Cooperação Científica.

THURSDAY 21 MAY

Sala Cavalieri - h. 9.30 am

**SYMPOSIUM BASED
ON BRAZILIAN AND ITALIAN SCIENTIFIC COOPERATION**

Sala Cavalieri - h. 4.15 pm

**12.12 Capsular morphological modifications with Trypan Blue
L.C. Porte (Rio de Janeiro, Brasil)**

SOI EVENTS - SYMPOSIA

Aggravation of cataract in cataract surgery: Italian and Brazilian experience
Prevalence of cataract in Italy and Brazil
Simultaneous transcataract Italian-Brazilian experience
 Chairman: C. Balestro (Brazil), M.A. Padilha (Rio de Janeiro, Brazil)
 Moderator: A. Cerni (Rio de Janeiro, Brazil), M. Piovella (Italy)

09.30 Italian-Brazilian scientific cooperation: why and how
 M. Natta, President SOI

09.35 Introduction to the Symposium
 C. Balestro (Italy)

09.40 Anterior and Posterior for correction of high ametropies
 J.R. Rendon (São Paulo, Brazil)

09.51 ICL Implantation for myopia correction
 G. Caramella (São Paulo, Brazil)

09.59 The role of corneal surface in refractive surgery
 P. Troiano (Italy)

10.07 Refractive Lens Exchange: personal considerations
 M.A. Padilha (Rio de Janeiro, Brazil)

10.18 Shallow Anterior Chamber as Indication for Refractive Lens Exchange
 M. Piovella (Italy)

10.26 Presbyopia treatment with radiofrequency: personal experience and results
 J.R. Rendon (São Paulo, Brazil)

10.37 Corneal Cross Linking 2 years follow-up
 R. Viquiera (Italy)

10.45 Refractive Surgery and Ophthalmology
 R. Dosi (Italy)

10.53 Discussion
 Anelise G. Merlin (Italy), G. Perone (Italy), J. Tassinari (Italy), V.D. Maffei (Italy)

11.10 Quality results with refractive lens implant
 M. Piovella (Italy)

11.18 Multifocal IOL: why bad results?
 A. Cerni (Rio de Janeiro, Brazil)

11.29 Multifocal IOL Implantation and Healthy Vision
 P. Cadenas (Italy)

11.37 Ink and Mucosa
 S. Rossi (Italy)

11.45 Surgical Management of Congenital Cataract
 A. Rappas (Italy)

11.53 Phacolytic cataract in special situations
 M.A. Padilha (Rio de Janeiro, Brazil)

12.04 Microincision Technique in Cataract Surgery
 G. La Rosa (Italy)

**12.12 Capsular morphological modifications with Trypan Blue
 L.C. Porte (Rio de Janeiro, Brazil)**

12.23 Management of subluxated lenses
 A. Cerni (Rio de Janeiro, Brazil)

12.34 Important aspects of retinal evaluation: the pre and post cataract surgery
 M. Natta (Rio de Janeiro, Brazil)

12.45 Management of anterior segment surgery complications: retinal surgery
 T. Rossi (Italy)

12.53 Discussion
 Anelise G. Merino (Italy), A. Caporaso (Italy), G. Caramella (Italy), M. Pardo (Italy)

13.15 End of the Session

7.7 Anexo G

Artigo publicado no periódico *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, com destaque e ganhando a capa, apresentando os dados finais da tese.

Referencia: J Cataract Refract Surg. 2010 Apr;36(4):582-7.

---

8 REFERÊNCIAS

-
1. Duke-elder S, Wybar KC. The Eye. In: *System of Ophthalmology the anatomy of the visual system*. Vol II. Londres: Henry Kimpton; 1961. p. 309-24.
  2. Streeten BW. The zonular insertion: A scanning electron microscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1977;16(4):364-75.
  3. Farnsworth PN, Mauriello JA, Burke-Gadomski P, Kulyk T, Cinotti AA. Surface ultrastructure of the human lens capsule and zonular attachments. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1976;15(1):36-40.
  4. Yanoff M, Fine BS. Lens. In: *Ocular Pathology*. 5^a ed. St. Louis: Mosby; 2002. p. 339-66.
  5. Grandberg L, Forseto AS, Souza RF, Nosé RM, Nosé W. Avaliação do envelhecimento do cristalino em olhos normais. *Arq Bras de Oftamol*. 2001;64(5):443-7.
  6. Waiswol M, Cursino JW, Cohen R. Variações nas dimensões do cristalino humano de acordo com a idade. *Arq Bras de Oftamol*. 2001;64(6):507-12.

-
7. Padilha M, Medeiros A, Gonçalves ER. Cristalino - embriologia, anatomia e biomicroscopia. In: *Catarata*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2008. p. 1-36.
  8. Duke-elder S, Weale RA. The lens. In: *System of Ophthalmology: The physiology of the eye and of vision*. Vol VI. Londres: Henry Kimpton; 1968. p. 365-91.
  9. Ishizaki Y, Voyvodic JT, Burne JF, Raff MC. Control of the lens epithelial cell survival. *J Cell Biol*. 1993;121(4):899-908.
  10. Kierszbaum AL. Órgãos sensoriais: visão e audição. In: *Histologia e Biologia Celular: uma introdução à Patologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 252-6.
  11. Yan Q, Blake D, Clark JI, Sage EH. Expression of the matricellular protein SPARC in murine lens: SPARC is necessary for the structural integrity of the capsular basement membrane. *J Histochem Cytochem*. 2003;51(4):503-11.
  12. Yurchenco PD, Schittny JC. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J*. 1990;4(6):1577-90.
  13. Danysh BP, Duncan MK. The lens capsule. *Exp Eye Res*. 2009;88(2):151-64.

-
14. Winkler J, Wirbelauer C, Frank V, Laqua H. Quantitative distribution of glycosaminoglycans in young and senile (cataractous) anterior lens capsules. *Exp Eye Res.* 2001;72(3):311-8.
  15. Fisher RF, Pettet BE. The postnatal growth of the capsule of the crystalline lens. *J Anat.* 1972;112(2):207-14.
  16. Yan Q, Perdue N, Blake D, Sage EH. Absence of SPARC in murine lens epithelium leads to increased deposition of laminin-1 in lens capsule. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(12):4652-60.
  17. Kierszembbaum AL. Epitélio. In: *Histologia e Biologia Celular: uma introdução à Patologia*. 2^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p.1-57.
  18. Wederell ED, De longh. Extracellular matrix and integrin signaling in lens development and cataract. *Semin Cell Dev Biol.* 2006;17(6):759-76.
  19. Oharazawa H, Ibaraki N, Lin LR, Reddy VN. The effects of extracellular matrix on cell attachment, proliferation and migration in a human lens epithelial cell line. *Exp Eye Res.* 1999;69(6):603-10.
  20. Zhou M, Leiberman J, Xu J, Lavker RM. A hierarchy of proliferative cells exist in mouse lens epithelium: implications on lens maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(7):2997-3003.

-
21. Bassnett S, Missey H, Vucemilo I. Molecular architecture of the lens fiber cell basal membrane complex. *J Cell Sci.* 1999;112(13):2155-65.
  22. Zelenka PS. Regulation of the cell adhesion and migration in lens development. *Int J Dev Biol.* 2004;48(8-9):857-65.
  23. Remington SG, Meyer RA. Lens cells may reside outside the lens capsule: na hypothesis. *Theor Biol Med Model.* 2007;4:22.
  24. Maidment JM, Duncan G, Tamiya S, Collison DJ, Wang L, Wormstone IM. Regional differences in tyrosine kinase receptor signaling components determine differential growth patterns in the human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(5):1427-35.
  25. Kierszembaum AL. Sinalização celular. In: *Histologia e Biologia Celular: uma introdução à Patologia.* 2ª ed. Rio de janeiro: Elsevier; 2008. p. 87-107.
  26. Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, Lubsen NH, Slingsby C, Tardieu A. Ageing and vision: structure and function of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol.* 2004 Nov;86(3):407-85.
  27. Slingsby C, Clout NJ. Structure of the crystallins. *Eye.* 1999;13(3):395-402.

-
28. Sun TX, Das BK, Liang JJ. Conformational and functional differences between recombinant human lens alphaA- and alphaB-crystallin. *J Biol Chem*. 1997;272(10):6220-5.
  29. Boyle DL, Takemoto L. A possible role for α -crystalins in lens epithelial cell differentiation. *Mol Vis*. 2000;6(1):63-71.
  30. Piatigorsky J. Lens crystallins and their genes: diversity and tissue-specific expression. *FASEB J*. 1989;3(8):1933-40.
  31. Horwitz J. Proctor Lecture. The function of alpha-crystallin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34(1):10-22.
  32. Cheng C, Xia CH, Li L, White TW, Niimi J, Gong X. Gap junction communication influences intercellular protein distribution in the lens. *Exp Eye Res*. 2008;86(6):966-74.
  33. Ehrmann K, Ho A, Parel JM. Biomechanical analysis of the accommodative apparatus in primates. *Clin Exp Optom*. 2008;91(3):302-12.
  34. Duke-elder S, Abrams D. Adjustments of the optical system. In: *System of Ophthalmology: ophthalmic optics and refraction*. Vol V. Londres: Henry Kimpton; 1970. p. 151-204.

-
35. Krag S, Olsen T, Andreassen TT. Biomechanical characteristics of the human anterior lens capsule in relation to age. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(2):357-63.
  36. Ziebarth NM, Borja D, Arrieta E, Aly M, Manns F, Dortonne I, Nankivil D, Jain R, Parel JM. Role of the lens capsule on the mechanical accommodative response in a lens stretcher. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(10):4490-6.
  37. Duncan G, Wormstone IM, Davies PD. The aging human lens: structure, growth, and physiological behaviour. *Br J Ophthalmol.* 1997;81(10):818-23.
  38. Costello MJ, Oliver TN, Cobo LM. Cellular architecture in age-related human nuclear cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992;33(11):3209-27.
  39. Karim AK, Jacob TJ, Thompson GM. The human anterior lens capsule: cell density, morphology and mitotic index in normal and cataractous lenses. *Exp Eye Res.* 1987;45(6):865-74.
  40. Kara-josé N, Bicas HEA, Carvalho RS. Cegueira por catarata. In: *Cirurgia de catarata: necessidade social.* São Paulo: C&D Editora e Gráfica; 2008. p. 43-59.

-
41. Thylefors B, Négrel AD, Pararajasegaram R, Dadzie KY. Global data on blindness. *Bull World Health Organ*. 1995;73(1):115-21.
  42. Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC, Klein R, Muñoz B, Friedman DS, Kempen J, TaylorHR, Mitchell P, Eye Diseases Prevalence Research Group. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol*. 2004;122(4):477-85.
  43. Kara-junior N, Schellini SA, Silva MRBM, Bruini LF, Almeida AGC. Projeto catarata - qual a sua importância para a comunidade?. *Arq Bras Oftalmol*. 1996;59(5):490-6.
  44. Gimbel HV, Neuhann T. Development, advantages, and methods of continous circular capsulorhexis technique. *J Cataract Refract Surg*. 1990;16(1):31-7.
  45. Marback FE, Freitas LL, Fernandez PF, Branco BC, Belfort RJR. Anterior capsule staining 0.025% Trypan blue in cataract without red reflex. *Arq Bras de Oftamol*. 2001;64(4):333-35.
  46. Vassada A, Singh R. Surgical techniques for difficult cataracts. *Curr Opin Ophthalmol*. 1999;10(1):46-52.

-
47. Hoffer KJ, McFarland JE. Intracameral subcapsular fluorescein staining for improved visualization during capsulorhexis in mature cataracts. *J Cataract Refract Surg.* 1993;19(4):566.
  48. Find O, Amon M. Anterior capsulotomy created by radiofrequency endodiathermy and continuous curvilinear posterior capsulorhexis in a patient with intumescent cataract and primary capsular fibrosis. *J Cataract Refract Surg.* 1998;24(6):870-1.
  49. Cimetta DJ, Gatti M, Labianco G. Hemocoloration of the anterior capsule in white cataract CCC. *Eur J Implant Refract Surg.* 1995;7:184-5.
  50. Melles GR, Waard PW, Pameyer JH, Houdijn Beekhuis W. Trypan blue capsule staining to visualize the capsulorhexis in cataract surgery. *J Cataract Refract Surg.* 1999;25(1):7-9.
  51. Singh G, Bohnke M, Von-Domarus D, Draeger J, Lindstrom RL, Doughman DJ. Vital staining of corneal endothelium. *Cornea.* 1985;86;4(2):80-91.
  52. Yetik H, Devranoglu K, Ozkan S. Determining the lowest trypan blue concentration that satisfactorily stains the anterior capsule. *J Cataract Refract Surg.* 2002;28(6):988-91.

-
53. Kayikicioglu O, Erakgun T, Gtuler C. Trypan blue mixed with sodium hyaluronate for capsulorhexis. *J Cataract Refract Surg.* 2001;27(7):970.
54. Dada VK, Sudan R, Sharma N, Dada T. Trypan blue with a viscoelastic agent. *J Cataract Refract Surg.* 2002;28(2):205-6.
55. Bhartiya P, Sharma N, Ray M, Sinha R, Vajpayee RB. Trypan blue assisted phacoemulsification in corneal opacities. *Br J Ophthalmol.* 2002;86(8):857-9.
56. Dada T, Ray M, Bhartiya P, Vajpayee RB. Trypan-blue-assisted capsulorhexis for trainee phacoemulsification surgeons. *J Cataract Refract Surg.* 2002;28(4):575-6.
57. Veckener M, van Overdam K, Monzer J, Kobuch K, van Marle W, Spekrijse H, van Meurs J. Ocular toxicity study of trypan blue injected into the vitreous cavity of rat eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2001;239(9):698-704.
58. Crema AS, Werner L, Apple DJ, Navarrete CP, Walsh A, Yamane Y. Impregnação permanente por azul de tripano em uma lente intra-ocular de hidrogel. *Rev Bras Oftalmol.* 2002;61(8):581-6.

59. Wollensak G, Sporl E, Pham DT. Biomechanical changes in the anterior lens capsule after trypan blue staining. *J Cataract Refract Surg.* 2004;30(7):1526-30.
60. Dick HB, Alyeva SE, Hengerer F. Effect of trypan blue on the elasticity of the human anterior lens capsule. *J Cataract Refract Surg.* 2008;34(8):1367-73.
61. Jardeleza MS, Daly MK, Kaufman JD, Klapperich C, Legutko PA. Effect of trypan blue staining on the elastic modulus of anterior lens capsules of diabetic and nondiabetic patients. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35(2):318-23.
62. Rangaraj NR, Ariga M, Thomas J. Comparsion of anterior capsule electron microscopy findings with and without trypan blue stain. *J Cataract Refract Surg.* 2004;30(10): 2241-42.
63. Portes AL, Monteiro ML, Allodi S, Miguel NC. Effect of trypan blue on lens epithelial cells in human eyes having capsulorhexis. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(6):1135-6.
64. Singh AJ, Sarodia UA, Brown L, Jagjivan R, Sampath R. A histological analysis of lens capsula stained with trypan blue for capsulorhexis in phacoemulsification cataract surgery. *Eye.* 2003;17(5):567-70.

-
65. Nanavaty MA, Johar K, Vasavada AR, Praveen MR, Zetterstrom C. Effect of trypan blue staining on the density and viability of lens epithelial cells in white cataract. *J Cataract Refract Surg*. 2006;32(9):1483-8.
  66. Apple DJ. Influence of intraocular lens material and design on postoperative intracapsular cellular reactivity. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2000;98:257-83.
  67. Apple DJ, Solomon KD, Tetz MR, Assia EI, Holland EY, Legler UF, Tsai JC, Castaneda VE, Hoggatt JP, Kostick AM. Posterior capsule opacification. *Surv Ophthalmol*. 1992;37(2):73-116.
  68. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992;119(3):493-501.
  69. Cao Y, Klionsky DJ. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res*. 2007;17(10):839-49.
  70. Schnider CM. Dyes In: Bartlett JD, Jaanus SD. *Clinical ocular pharmacology*. 3th edition. Massachussets: Butterworth-Heinemann; 1995. p.389-407.

71. Jacobs DS, Cox TA, Wagoner MD, Ariyasu RG, Karp CL. Capsule staining as an adjunct to cataract surgery. *Ophthalmology*. 2006;113(4):707-13.
72. Norn MS. Per operative trypan blue vital staining of corneal endothelium. Eight years follow up. *Acta Ophthalmol. (Copenh)* 1980;58(4):550-5.
73. Charakidas A, Kalogeraki A, Tsilimbaris M, Koukoulomatis P, Brouzas D, Delides G. Lens epithelial apoptosis and cell proliferation in human age-related cortical cataract. *Eur J Ophthalmol*. 2005;15(2):213-20.
74. Harocopos GJ, Alvares KM, Kolker AE, Beebe DC. Human age-related cataract and lens epithelial cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(13):2696-706.
75. Masket S. Postoperative complications of capsulorhexis. *J Cataract Refract Surg*. 1993;19(6):721-4.
76. Davison JA. Capsule contraction syndrome. *J Cataract Refract Surg*. 1993;19(5):582-9.

-
77. Saika S, Kawashima Y, Miyamoto T, Okada Y, Tanaka S, Yamanaka O, Ohnishi Y, Ooshima A, Yamanaka A. Immunohistochemical identification of proteoglycan types in fibrotic human capsules with intraocular lens implants. *Jpn J Ophthalmol*. 1998;42(5):368-72.
  78. Pandey SK, Apple DJ, Werner L, Maloof AJ, Milverton EJ. Posterior capsule opacification: a review of the aetiopathogenesis, experimental and clinical studies and factors for prevention. *Indian J Ophthalmol*. 2004 Jun;52(2):99-112.