

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

FERNANDO VISSANI FERNANDES

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MIRNAS EM LENTES DE
CÃES PORTADORES DE CATARATA IMATURA E MADURA

ARAÇATUBA - SP

2021

FERNANDO VISSANI FERNANDES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MIRNAS EM LENTES DE CÃES
PORTADORES DE CATARATA IMATURA E MADURA**

Trabalho de tese apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária de
Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista - “Júlio de Mesquita Filho” -
UNESP, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Ciência Animal (Fisiopatologia Médica
e Cirúrgica)

Orientador: Prof. Associado. Alexandre Lima de Andrade

Araçatuba - SP

2021

F363a Fernandes, Fernando Vissani
Análise da expressão de miRNAs em lentes de cães
portadores de catarata imatura e madura / Fernando Vissani
Fernandes. -- Araçatuba, 2021
75 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientador: Alexandre Lima de Andrade

1. Catarata. 2. Cão. 3. Epigenética. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Análise da expressão de miRNAs em lentes de cães portadores de catarata imatura e madura

AUTOR: FERNANDO VISSANI FERNANDES

ORIENTADOR: ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. PAULA DINIZ GALERA (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - UnB

Dra. RAFAELA BEATRIZ PINTOR TORRECILHA (Participação Virtual)
Doutora em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal/UNESP

Araçatuba, 30 de agosto de 2021.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Análise da expressão de miRNAs em lentes de cães portadores de catarata imatura e madura

AUTOR: FERNANDO VISSANI FERNANDES

ORIENTADOR: ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÔ (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. PAULA DINIZ GALERA (Participação Virtual)

Departamento de Medicina Veterinária / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - UnB

Dra. RAFAELA BEATRIZ PINTOR TORRECILHA (Participação Virtual)

Doutora em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal/UNESP

Araçatuba, 30 de agosto de 2021.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Análise da expressão de miRNAs em lentes de cães portadores de catarata imatura e madura

AUTOR: FERNANDO VISSANI FERNANDES

ORIENTADOR: ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÔ (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. PAULA DINIZ GALERA (Participação Virtual)

Departamento de Medicina Veterinária / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - UnB

Dra. RAFAELA BEATRIZ PINTOR TORRECILHA (Participação Virtual)

Doutora em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal/UNESP

Araçatuba, 30 de agosto de 2021.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Análise da expressão de miRNAs em lentes de cães portadores de catarata imatura e madura

AUTOR: FERNANDO VISSANI FERNANDES

ORIENTADOR: ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Paula Diniz Galera

Profa. Dra. PAULA DINIZ GALERA (Participação Virtual)

Departamento de Medicina Veterinária / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - UnB

Dra. RAFAELA BEATRIZ PINTOR TORRECILHA (Participação Virtual)

Doutora em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal/UNESP

Araçatuba, 30 de agosto de 2021.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Análise da expressão de miRNAs em lentes de cães portadores de catarata imatura e madura

AUTOR: FERNANDO VISSANI FERNANDES

ORIENTADOR: ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

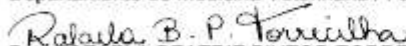
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. PAULA DINIZ GALERA (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - UnB


Dra. RAFAELA BEATRIZ PINTOR TORRECILHA (Participação Virtual)
Doutora em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal/UNESP

Araçatuba, 30 de agosto de 2021.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu orientador, Alexandre Lima de Andrade, por dedicar do seu tempo diante de tantos compromissos e funções a ele atribuídas, pela paciência, incentivo e por todo o ensinamento a mim transferido durante esta nossa trajetória. Obrigado pela oportunidade de caminhar ao seu lado, pelas vezes que precisou me advertir com a finalidade de me policiar, pela confiança e pelos conselhos. O conheço de longa data e sempre cultivei muita estima pela pessoa incrível e o profissional de excelência que é.

Aos meus pais, agradeço pelas condições dadas com muito custo e esforço, por sempre priorizarem a minha educação, mesmo quando no passado, não tiveram nem a décima parte da oportunidade que tive ao longo desses anos. Também por todo o amor, pelo apoio incondicional e incentivo constante. Por nunca deixarem de acreditar que eu seria capaz, mesmo quando eu não acreditava. Vocês são meu porto seguro, eu amo muito vocês.

À minha irmã Valquíria, que desde as minhas remotas lembranças sempre foi meu ponto referencial de sucesso e comprometimento. Obrigado por ser um exemplo de responsabilidade admirável, qualidade esta que me espelho em você. Agradeço também por trazer ao mundo as duas maiores joias da minha vida: Júlia e Vítor.

Aos amigos e companheiros de pós-graduação, Thiago, Daniela, Leonardo, Natália, Edenilson e Tawane, agradeço pelo apoio, conselhos, trocas de experiências, dias de trabalho e colaboração incansável, sem vocês nada disso seria possível.

Às professoras Flávia Lombardi Lopes, Juliana Regina Peiró e Flávia de Almeida Lucas, por cederem seus laboratórios e equipamentos para processamento das amostras deste experimento.

À professora Flávia Lombardi Lopes, por toda a disponibilidade e paciência para ensinamentos ao longo desta caminhada.

Agradeço ainda aos amigos e companheiros de trabalho Luis Gustavo, Rafaela e Anne pelos dias de aprendizado, apoio incondicional e por fazerem dos meus dias como médico veterinário patologista serem os melhores já vivenciados. Obrigado por permitirem que eu integre uma equipe genial como essa.

Agradeço ao meu companheiro na vida e no amor, Luis Fernando, pelos nossos 10 anos de caminhada, na construção do sentimento mais nobre que é o amor. Obrigado por ser meu apoio e minha força, por não deixar que eu me abalasse tantas

vezes e nunca deixar de estar ao meu lado em todo esse processo. Hoje os frutos que colhemos são resultados das nossas batalhas. Não poderia haver alguém no mundo como você é para mim. Eu te amo.

Agradeço ainda a todos os amigos que a vida me concedeu, desde os que cultivo laços da infância aos que ingressaram na minha vida recentemente. A vida certamente é mais bonita quando se tem amigos para contar.

Obrigado a todos os animais que estiveram presente em minha vida e de alguma forma influenciaram na minha formação e construção do sentimento pelo amor aos animais, desde os que já partiram desta vida, aos que recentemente chegaram. Obrigado Tiara, Brenda, Pedrita, Bijuca, Bento, Kiara e Lucky.

À minha psicóloga Natália Massaroto Pavoni, por me auxiliar na construção do pensamento e edificação do campo emocional. Obrigado por despertar em mim o que havia de melhor como indivíduo, alicerçando minha autoconfiança e controle de situações adversas. Seu trabalho incansável e parceria foram fundamentais para minha sustentação até aqui.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela concessão da bolsa. Sem o devido apoio ao pesquisador, quer seja ele financeiro ou técnico, torna-se ainda mais árduo o caminho da pesquisa, que naturalmente apresenta suas próprias dificuldades.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto de pesquisa que foi essencial para realização do experimento (Processo nº 2017/26204-2).

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA - UNESP), por disponibilizar os meios necessários para desenvolvimento do projeto de pesquisa e por todo o aprendizado oferecido desde a graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal por todo suporte fornecido se prontificando a solucionar todas as dúvidas e dificuldades que surgiram.

E por último, porém não menos importante, à Deus, por me guiar em dias de tribulação, jamais soltar a minha mão em momentos em que achei estar sozinho e por providenciar que todas as coisas acontecessem no tempo exato e perfeito que deveriam acontecer.

“Que haja uma luz nos lugares mais escuros, quando todas as outras luzes se apagarem. ”

J. R. R. Tolkien



FERNANDES, F. V. **Análise da expressão de miRNAs em lentes de cães portadores de catarata imatura e madura.** 2021. 67 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

RESUMO

A catarata se caracteriza como principal causa de perda de visão em cães, afetando animais mestiços ou de raças puras, podendo ser classificada segundo o estágio de desenvolvimento, a área da lente acometida, a idade do paciente, fatores genéticos e quanto à consistência da lente. O presente estudo objetivou realizar a análise da expressão global de *miRNAs* de cães portadores de catarata, bem como inferir possíveis vias biológicas de atuação de *miRNAs* no desempenho da regulação desta condição patológica. Para tanto, fragmentos de 4-5mm oriundos das cápsulas anteriores obtidas da capsulorrexe da cirurgia de facoemulsificação, foram colhidos de 15 animais com catarata imatura e 15 animais com madura, além de fragmentos de igual tamanho, de 15 animais saudáveis e com lentes transparentes, que constituíram o grupo controle. As amostras obtidas foram submetidas ao processo de extração de RNA e posteriormente quantificadas quanto a sua concentração. A análise da expressão global de *miRNAs* utilizou os *strips GeneChip™ mirna 4.1 Array Strip* (Affymetrix®). Dois *miRNAs* menos expressos foram identificados nas cataratas imaturas de cães em comparação às lentes transparentes. Os *miRNAs* expressos foram o cfa-miR-1307 e cfa-miR-450b que, provavelmente, participam do processo de apoptose das células epiteliais da lente e inibição da proliferação celular. Presume-se, ainda, que o cfa-miR-450b, também atue nas vias do TGF-beta, correlacionado a indução das células epiteliais da lente a sofrerem alterações morfológicas, com transformação das mesmas em células fusiformes, justificando, por vezes, a ocorrência de irregularidade na superfície capsular e deposição de matriz extracelular. Enfatiza-se, que se trata da primeira descrição sobre a expressão de *miRNAs* em lentes caninas.

Palavras-chave: Catarata. Cão. Epigenética.

FERNANDES, F. V. **Analysis of miRNA expression in dog lenses with immature and mature cataracts.** 2021. 67 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

ABSTRACT

Cataract is the main cause of vision loss in dogs, affecting crossbred or purebred animals, depending on the stage of development, the affected lens area, the patient's age, genetic factors and lens consistency. This aim of this study was to evaluate the global expression of miRNAs from dogs with cataracts as well as to verify molecular evidence of the role of these miRNAs in the regulation of this pathological condition. Then, 4-5mm fragments from the anterior capsulorhexis capsules obtained in the phacoemulsification surgery were collected from 15 animals with immature and 15 animals with mature cataract, in addition to fragments of equal size, from 15 healthy animals with transparent lenses, which constituted the control group. The sample were subjected to RNA extraction and had their concentration quantified. An analysis of the global expression of miRNAs uses GeneChip™ mirna 4.1 Array Strip (Affymetrix®) strips. Two miRNAs down-regulated were identified in immature cataracts in dogs compared to the control group. The expressed miRNAs were cfa-miR-1307 and cfa-miR-450b, which probably participate in the process of apoptosis of lens epithelial cells and inhibition of cell proliferation. It is also assumed that cfa-miR-450b acts on TGF-beta pathways, correlated with the induction of lens epithelial cells to undergo morphological changes, with transformation of them in spindle cells, sometimes justifying the occurrence of irregularity on the capsular surface and extracellular matrix deposition. It should be emphasized that this is the first description of the *miRNAs* expression in canine lenses.

Keywords: Cataract. Dog. Epigenetic.

LISTA DE ABREVIações

ARVO *Association for Research in Vision and Ophthalmology*

CRI Catarata relacionada a idade

CRYAA Cristalina Alfa-A (*Crystallin Alpha A*)

DNA Ácido Desoxirribonucleico

FMVA Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba

I/A Irrigação e Aspiração

KEGG *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

Kg Quilogramas

LEC Células do epitélio da lente (*Lens epithelial cells*)

mg Miligramas

miRNA MicroRNA

mL Mililitro

mm Milímetro

mTOR Alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian-target of rapamycin*)

ng Nanogramas

OMS Organização Mundial de Saúde

PI3K-AKT Fosfatidilinositol 3-quinase – proteína quinase

RNA Ácido ribonucleico

RNA_m RNA (ácido ribonucleico)-mensageiro

ROS Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

RPM Rotações por minuto

RT-PCR Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (*Real Time Polymerase Chain Reaction*)

SP São Paulo

TAC *Transcriptome Analyses Console*

TGF Fator de Crescimento Tecidual (*Tecidual Growth Factor*)

TUNEL Marcação de "nicks" por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*)

UNESP Universidade Estadual Paulista

UTR Região Não Traduzida (*Untranslated Region*)

μl Microlitros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens fotográficas de cães submetidos ao exame de eletrorretinografia, utilizando-se o equipamento BPM-300 (RetinoGraphics®). (A) visão frontal dos eletrodos em paciente com catarata imatura (Maltês, F, 7 anos de idade); (B) Visão do equipamento manual portátil em exame em paciente com catarata (Pinscher, F, 8 anos); (C) detalhe do blefarostato plástico e eletrodos e (D) traçado eletroretinográfico de paciente com catarata imatura em padrão normal com formação de onda-a (a partir do eixo da diretriz até 1) e onda-b (de 1 a 2) na imagem. Nota: O programa computacional *RetinoGraphics*® comandou o número de apresentações e a duração dos estímulos luminosos, sendo utilizado o protocolo da “Internacional Society for Clinical Electrophysiology of Vision” (ISCEV) (McCULLOSH et al., 2015).

29

Figura 2 - Imagens fotográficas referentes ao procedimento de facoemulsificação de um cão com catarata imatura (Fêmea, 7 anos). (A) incisão auxiliar; (B) injeção de bolha de ar; (C) injeção de azul de tripano para colorir a cápsula anterior; (D) injeção na câmara anterior de substância viscoelástica (coesivo – metil-celulose) para manutenção da câmara anterior, subsequente à aplicação da substância viscoelástica dispersiva (hialuronato); (E) incisão de trabalho usando bisturi de 2.75; (F) capsulorrexe concluída (etapa em que os fragmentos foram colhidos); (G) facoemulsificação; (H) introdução da lente intraocular (LIO) e (H e I) Pós-operatório imediato.

33

Figura 3 - Representação esquemática da lente. A) Imagem do corte sagital da lente sob esquema identificando suas estruturas: ANT: cápsula anterior da lente; POST: cápsula posterior da lente; E, F, A: núcleo da lente e C: córtex da lente. Observar abaixo da cápsula anterior da lente, camada unicelular que se estende até a região equatorial da lente (limite entre a cápsula anterior e posterior). B) Fragmento de lente de cão corado por azul de tripano, após manobra de capsuloerex, na facoemulsificação.

34

Figura 4 - Imagens fotográficas alusivas ao processamento das amostras (cápsula anterior da lente) obtidas a partir de capsuloerex curvilinear na facoemulsificação de cães portadores de catarata. Etapas de extração do RNA utilizando o kit de extração *mirVANA miRNA Isolation kit (Life Technologies)*, seguindo as instruções do fabricante. (A) limpeza de todo material e bancada da capela de fluxo; (B) manobra de embebição da amostra com o tampão de lise; (C) amostra embebida pelo tampão de lise. Notar a cápsula colhida impregnada pelo azul de tripano; (D) pipetagem de 50µl de miRNA homogenato (reagente do kit de extração); (E) Homogeneização da amostra diluída em tampão de lise no homogeneizador; (F) amostra sendo submetida à mistura em vórtex por 60 segundos, em meio à 500µl de fenol clorofórmio; (G) mistura composta de sobrenadante diluído em 1,25 volumes de etanol do valor em µl do sobrenadante; (H) amostras acondicionadas na centrífuga; (I) preparo para centrifugação do filtro da coluna para obtenção do RNA extraído em suspensão ao meio de lavagem “wash 2/3”; (J) amostra eluída em H₂O ultra-pura e preparada para leitura no Nanodrop®; (K) pipetagem de 1µl do composto de extração no

37

leitor do Nanodrop® (espectrofotometria) (K) imagem do Nanodrop®.

- Figura 5** - Imagem representativa do *strip* GeneChip™ miRNA 4.1 Array Strip (Affymetrix®) utilizado para análise global de microRNAs. 39
- Figura 6** - Gráfico de Volcano (valor de P x *Fold change*) da expressão dos *miRNAs* quando comparados entre os grupos. A) Os dois pontos verdes representam graficamente os *miRNAs* infra-regulados, sendo: cfa-miR-1307 ($P = 0,0016$ e *fold change* = -2,26) e cfa-miR-450b ($P=0,0097$ e *fold change* = -5,11) (setas); B) não há expressão de *miRNA* entre os grupos controle e madura; C) não há expressão de *miRNA* entre os grupos imatura e madura. 45
- Figura 7** - A) Nível de expressão do cfa-miR-450b no grupo catarata imatura x grupo controle; B) Nível de expressão do cfa-miR-1307 no grupo catarata imatura x grupo controle. 47
- Figura 8** - Alinhamento entre os *miRNAs* caninos e seus respectivos homólogos humanos utilizando o programa online MUSCLE: A- cfa-miR-1307 e hsa-miR-1307-3p; B- cfa-miR-450b e hsa-miR-450b-5p. 49
- Figura 9** - Heat map amplificado do *miRNAs* diferencialmente expressos da análise de microarranjo do grupo catarata imatura e controle. Os autores realizaram três ensaios de *microarrays* separados para cada grupo. O valor de expressão relativa é demonstrado através do gradiente de cor de vermelho a verde onde, vermelho indica maior nível de expressão e a cor verde, menor nível de expressão de *miRNA*. As diferenças de dobra correspondem ao sombreamento de cor. 50

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Dados referentes às amostras colhidas para o estudo e processadas para extração de RNA de forma individual e em *pool* de dois grupos (imatura, madura e controle). 42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Concentração (ng/ μ l) e Volume (μ l) de RNA extraídos nos *pools*, a partir de fragmentos oriundos da capsulorrexe da cirurgia de facoemulsificação de cães portadores de catarata imatura, madura e lentes normais. 43
- Tabela 2** - Média e desvio-padrão, *fold change* e valor de *P* da expressão de *miRNAs* infra-regulados, quando comparados os grupos de catarata imatura e controle. 44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Embriogênese, histologia e anatomia do bulbo do olho	19
2.2 Aspectos gerais da catarata no cão	21
2.3 Aspectos epigenéticos da catarata no homem e no cão	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Aspectos éticos	28
3.2 Pacientes: cães	28
3.3 Procedimento cirúrgico para obtenção das amostras de tecido	30
3.3.1 Procedimentos pré-operatórios	30
3.3.2 Procedimentos anestésicos	31
3.3.3 Intraoperatório	31
3.3.4 Procedimentos pós-operatórios	35
3.3.5 Extração do RNA a partir de fragmentos de cápsulas anteriores da lente	35
3.4 Análise transcriptômica (miRNAs)	39
3.4.1 Análise estatística dos resultados da expressão global de miRNAs	40
4 RESULTADOS	41
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA	70

1 INTRODUÇÃO

A catarata se constitui na principal causa de cegueira no homem em todo o mundo, com exceção dos países desenvolvidos (RESNIKOFF, 2004). A cada ano, no Brasil, são diagnosticados 100 mil casos novos de catarata e um número, também, expressivo em animais, notadamente em cães. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência anual de catarata é estimada em 0,3% ao ano. Isso representaria, no Brasil, cerca de 550.000 novos casos por ano (TALEB, 2009). E há quem considere que se trata de um problema de saúde pública, devido ao grande número de pessoas com a doença (MEDINA, 2011). As estatísticas apontam a necessidade de estudos visando obter maiores detalhamentos quanto aos fatos (BRIAN & TAYLOR, 2001).

Em medicina veterinária, a catarata também se constitui na principal causa de perda de visão em cães, afetando animais mestiços ou de raças puras (WHITLEY et al., 1993, GELATT, 2007; GLOVER & CONSTANTINESCU, 1997). Ela pode ser classificada segundo o estágio de desenvolvimento, a área da lente acometida, a idade do paciente, fatores genéticos e quanto à consistência da lente (SLATTER, 1990).

A catarata, em cães, pode ser definida como a opacidade da lente ou de sua cápsula, decorrente de alterações da arquitetura lamelar de suas fibras ou da cápsula (BARNETT, 1985; JOHNSON e MILLER, 1990; GLOVER e CONSTANTINESCU, 1997; GELATT, 2007; LA CROIX, 2008). Diversas causas têm sido imputadas, porém, na maioria dos casos, muitas permanecem, ainda, desconhecidas (BARNETT, 1985; GELATT, 2007). Portanto, trata-se de assunto que merece novas e originais investigações. Opostamente, são inegáveis os avanços das pesquisas voltadas para identificação das causas, na oftalmologia humana. Neste sentido, pesquisas são conduzidas sob os aspectos clínicos, terapêuticos e moleculares e, algumas delas, versando sobre epigenética.

A epigenética é definida como o estudo de processos que produzem um fenótipo herdável, mas que não dependem estritamente da sequência de DNA (ácido desoxirribonucleico), ou seja, eventos epigenéticos são aqueles que alteram o fenótipo sem modificar o genótipo e, que são herdáveis (NICIURA e SARAIVA, 2014). Entretanto, modificações nos padrões epigenéticos normais podem levar a ocorrência de doenças e estão, portanto, envolvidos tanto em processos fisiológicos, como no

desenvolvimento, crescimento e envelhecimento e, ainda, envolvidos em processos patológicos, na etiologia de algumas doenças do homem e de animais. Assim, além do código genético, fatores epigenéticos interferem na expressão gênica e no fenótipo dos indivíduos. A epigenética associada à genética tem elevado o nível de compreensão de muitos processos fisiológicos e patológicos que ocorrem nos seres vivos. Vários métodos já foram empregados em estudos desta natureza e, entre eles, que se propuseram a estudar a expressão gênica global e o perfil de *miRNA* (microRNA), incluindo análise de *microarray*, sequenciamento, RT-PCR e hibridização *in situ* (FREDERIKSE et al., 2006; TIAN et al., 2010). Recentemente, alguns pesquisadores utilizaram uma ferramenta baseada em *microarray* com ênfase na catarata, que se constitui em uma abordagem que combina biologia molecular e bioinformática para permitir a análise simultânea da expressão global de RNAs codantes e seus reguladores, os *miRNAs* (WILSON et al., 2002), como explicaremos a seguir. Mas, em medicina veterinária, há poucos relatos do emprego destas tecnologias na busca de informações sobre os mecanismos envolvidos na gênese desta doença em cães.

Em medicina humana, as pesquisas avançadas remetem ao estudo dos *miRNAs*. Eles se constituem em um tipo não-codante de pequenos RNAs em animais, plantas e fungos, com a função de regular os níveis de expressão dos genes alvo, ligando-se imperfeitamente a regiões não traduzidas (3'UTR – 3' *untranslated regions*) desses RNAs-alvo. Eles desempenham a função de atenuar a tradução de proteínas, e são altamente conservados. Sabe-se, ainda, que eles têm padrões específicos de expressões temporais e teciduais, em uma ampla gama de espécies (MISKA et al., 2004; ARORA et al. 2007), indicando que os *miRNAs* desempenham papéis importantes na regulação de diversos processos fisiológicos (como desenvolvimento e senescência) e em processos patológicos.

As lentes humanas e, também dos animais, são tecidos relativamente isolados que contribuem para a refração da luz para a retina e são cercados pelo humor aquoso e pelo vítreo. As lentes são transparentes nos pacientes humanos jovens e em animais, mas mudanças em sua arquitetura e constituição ocorrem à medida que o organismo envelhece. Essas mudanças incluem o desenvolvimento de um núcleo duro e compacto, opacidades focais e, finalmente, o desenvolvimento da catarata. Essas características permitem que as lentes sejam usadas como modelos adaptativos para estudar a função dos *miRNAs* nas cataratas. Até o momento, alguns

miRNAs foram identificados nos olhos dos animais (em modelos murinos) (RYAN et al., 2006; KARALI et al., 2007), especialmente na córnea e, outros detectados na lente. No entanto, nenhum deles foram descritos em cães. Os perfis de expressão de *miRNA* em lentes humanas continuam a ser estabelecidos e, há poucas investigações a despeito com intuito de se determinar os perfis de expressão de *miRNAs* nas cataratas. Wu et al. (2012) identificaram 206 *miRNAs* por ensaios de *microarray*, e verificaram que a expressão de 15,53% deles apresentou variações superiores à duas vezes na expressão relativa entre lentes humanas transparentes e cataratas. Este foi o primeiro estudo que determinou diferentes perfis de expressão de *miRNAs* no epitélio central de lentes humanas transparentes e cataratosas, relacionadas à idade.

Como base nas assertivas descritas acima intentou-se, com este projeto de pesquisa, realizar a análise da expressão global de *miRNAs* de cães portadores de catarata, bem como verificar evidências moleculares do papel de *miRNAs* no desempenho da regulação desta condição patológica. Os *miRNAs*, encontram-se catalogados em inúmeras bases de dados como a miRBase (KOZOMARA e GRIFFITHS-JONES, 2011), com informação sobre a sua origem genômica e acesso à sua sequência e ao seu alvo, quando conhecido. As cataratas são uma condição causada pela senescência, mas a etiologia não foi explicada até o momento. Ressalta-se que, em cães, não há relatos e nem explicações para sua ocorrência sob este ponto de vista. Os resultados podem apontar para futuros estudos versando sobre terapias epigenéticas, pois ao contrário das mutações de DNA, as modificações epigenéticas são reversíveis e podem ser modificadas de maneira favorável, por meio de tratamentos que visem a correção de erros epigenéticos (NICIURA e SARAIVA, 2014).

Salientamos que, para conduzir o referido projeto, contamos com recursos físicos, equipamentos e uma pesquisadora associada com ampla experiência no emprego de tecnologias aplicadas em epigenética, que serão descritas a seguir.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Embriogênese, histologia e anatomia do bulbo do olho

A embriogênese do bulbo do olho relaciona o envolvimento de múltiplas camadas embrionárias, tais como neuroectoderma, ectoderma superficial e mesênquima periocular, iniciando-se na vida fetal podendo se estender, nos carnívoros, até a quinta ou sexta semana pós-natal (ZACHARY, 2017).

O desenvolvimento do olho se inicia no começo do período gestacional, como um prolongamento do prosencéfalo primitivo. Sob forma vesicular, essa estrutura cresce a partir do encéfalo no sentido ao ectoderma superficial, estabelecendo, assim, uma ligação com o tecido cerebral pelo pedúnculo óptico (ZACHARY, 2017). Ao se aproximar do ectoderma que o recobre, ocorre um aumento da espessura da camada superficial, que é conhecido como placoide do cristalino. Essa nova estrutura se distancia do ectoderma e se invagina para que ocorra a formação de uma vesícula óptica de forma esférica. À medida que esse movimento ocorre, a vesícula se colaba, resultando na formação do cálice óptico que é composto por duas camadas (ectoderma superficial e mesênquima). Após o afastamento da vesícula óptica, o ectoderma se aloja sobre o cristalino, originando o epitélio da córnea. A existência desse epitélio atrai múltiplas camadas de deposição de tecido mesenquimal que possuem por finalidade a formação do estroma corneal e a camada endotelial da córnea. O tecido mesenquimal migra a partir da crista neural, que posteriormente será direcionado para a formação da esclera, porção estromal da úvea e, temporariamente, o sistema vascular embrionário que irriga as demais estruturas em formação (ZACHARY, 2017).

O ectoderma embrionário que reveste a lente, apresenta uma diferenciação resultando na formação da córnea e do cristalino. A lente do cristalino, por sua vez recebe a deposição de mais camadas, chegando ao total de 29 lâminas que constituem, inicialmente, o córtex da lente. (ZACHARY, 2017; BOEVÉ, VAN DER LINDE-SPIMAN, STADES 1989).

O globo ocular é formado por três camadas (ou túnicas). A túnica fibrosa é constituída pela córnea e a esclera, localizando-se mais externamente. A túnica média ou vascular é formada pela úvea (íris, corpo ciliar e coróide). A túnica nervosa, por

sua vez, é composta pela retina e disco óptico (HELPER, 1989; GELATT, 2007). As estruturas que conferem transparência ao olho são a córnea, o humor aquoso, lente e o vítreo. Essas estruturas agem de forma conjunta na transmissão e na refração da luz para a retina e auxiliam na manutenção da pressão intraocular, que mantém a forma esférica do olho sob consistência adequada (GELATT, 2007).

As estruturas responsáveis por promover refração dos olhos são a córnea e a lente. O poder de refração é determinado por seus raios de curvatura e índices de refração entre os meios (SLATTER, 2005). A córnea detém a maior parte do índice refrativo do olho em cães, diretamente relacionado à diferença nos índices de refração entre o ar e o tecido (GELATT, 2007). A lente é uma estrutura em forma elipsoide, biconvexa, transparente e avascular, e se encontra ancorada, equatorialmente, ao corpo ciliar por meio das fibras zonulares, mantendo-se suspenso posteriormente à íris e anteriormente ao vítreo. Esta estrutura é nutrida a partir do contato com humores aquoso e vítreo. Os raios de curvatura das superfícies anterior e posterior diferem entre si, sendo a anterior a de menor curvatura, e cujos centros são denominados de polos anterior e posterior (SLATTER, 2005).

O cristalino, ou lente, possuem função de transmissão da luz, característica inerente à transparência apresentada, poder de refração (devido à sua curvatura) e na focalização da imagem na retina, por sua capacidade de acomodação. A acomodação visual refere-se, portanto, à alteração do grau de convexidade da lente e, por conseguinte, da sua curvatura. Isto só é possível, devido a elasticidade da lente que permite que sua curvatura se altere por ação exercida pelos músculos ciliares através dos ligamentos zonulares (SLATTER, 2005; GELATT, 2007).

Anatomicamente, a lente é composta por cápsula (anterior e posterior), epitélio anterior (abaixo da cápsula anterior), núcleo da lente (na porção central), fibrilas lenticulares que constituem o córtex da lente e por substância amorfa colágena (SLATTER, 2005). A lente dos animais domésticos é, proporcionalmente, maior do que a do homem. No cão, ela possui aproximadamente 0,5mL de volume, 7,0mm de comprimento anteroposterior e diâmetro equatorial de 10,0mm (GELATT, 2007).

Ao longo do processo de morfogênese lenticular, duas linhagens celulares se originam, sendo uma epitelial e outra mesenquimal com diferenciação fibroblástica. Sabe-se que o epitélio da porção anterior da lente é composto por uma monocamada de células epiteliais cuboides, caracterizadas por intensa adesão intercelular e com potencialmente aderidas à cápsula anterior da lente. O estroma do cristalino, por sua

vez, apresenta uma deposição de fibroblastos compactados associado a matriz colágena e que possuem íntima comunicação com a porção posterior da lente. As células fusiformes surgem ao longo do processo de embriogênese a partir das células epiteliais da porção posterior da lente, sendo submetidas à diferenciação e proliferação celular (LANG AND MCAVOY, 2004). Essas células se dividem de modo que as fibras lenticulares que formam a lente sejam produzidas e depositadas ao longo da vida. A porção posterior da lente não possui células epiteliais em condições fisiológicas. Do mesmo modo, as fibrilas localizadas na porção central da lente, não possuem núcleos celulares, pois são mais antigas. (TREUTING, DINTZIS, MONTINE, 2017).

2.2 Aspectos gerais da catarata no cão

A principal causa de perda da percepção visual em cães é a catarata, afetando animais mestiços ou de raça pura (GLOVER & CONSTANTINESCU, 1997; GELATT, 2007). Inúmeras etiologias são aventadas, no entanto, muitas ainda são desconhecidas (BARNETT, 1985). As causas podem ser classificadas de acordo com alguns fatores que são comuns aos pacientes tais como: a idade do paciente no momento do aparecimento (WHITLEY et al., 1993; GELATT, 2007); a posição anatômica da lesão; o estágio de desenvolvimento; e as causas suscitantas (BARNETT, 1985; FISCHER, 1989; DZIEZYC, 1990; JOHNSON e MILLER, 1990; WHITLEY et al., 1993; GLOVER e CONSTANTINESCU, 1997; GELATT, 2007). A classificação baseada na idade do paciente e momento da sua manifestação é descrita como: congênita; do desenvolvimento (juvenil e adulta) e senil (FISCHER, 1989; WHITLEY et al., 1993; GELATT, 2007). Em relação à posição anatômica, as cataratas são denominadas nucleares, corticais, capsulares e subcapsulares; e quanto ao grau de desenvolvimento, elas podem ser incipientes, imaturas, maduras, hipermaturas e hipermaturas com reabsorção. Podem, ainda, ser hereditárias, nutricionais, tóxicas, metabólicas e traumáticas (BARNETT, 1985; FISCHER, 1989; DZIEZYC, 1990; JOHNSON e MILLER, 1990; WHITLEY et al., 1993; GLOVER e CONSTANTINESCU, 1997).

O surgimento da catarata relacionada a idade, exerce um papel de biomarcador de envelhecimento no cão, estabelecendo uma relação direta entre o tamanho da raça

que é inversamente proporcional à expectativa de vida do animal (URFER; GREER; WOLF, 2011).

É possível, ainda, se classificar as cataratas em primárias e secundárias. As primárias se referem àquelas quando não há histórico de doença anterior e somente a lente está envolvida; as secundárias são aquelas cuja causa de base advém de alteração em outra estrutura ocular ou sistêmica.

As cataratas hereditárias primárias manifestam-se nas primeiras semanas ou meses de vida e são progressivas. Nem todas, porém, culminam com o acometimento total da lente e perda da percepção visual. Quase sempre, elas são bilaterais, mas não necessariamente simétricas. As cataratas hereditárias secundárias estão associadas a outras afecções hereditárias, entre elas, a persistência da membrana pupilar, a atrofia progressiva de retina, a luxação da lente e ao glaucoma primário (BARNETT, 1985; BARNETT, 1988). Cataratas hereditárias já foram descritas em Poodle Standard (BARNETT e STARTUP, 1985), Pastor Alemão (BARNETT, 1986), Schnauzer Miniatura (SHASTRY e REDDY, 1994), Golden e Labrador Retriever (CURTIS e BARNETT, 1989), Chow-Chow (COLLINS et al., 1992), Norwegian Buhund (BARNETT, 1988; BJERKÅS e HAALAND, 1995) e Rottweiler (BJERKÅS & BERGSJØ, 1991).

Além da predisposição racial que alguns cães apresentam ao desenvolvimento da catarata, estudos anteriores sugerem que o estrógeno pode exercer um papel importante nos mecanismos moleculares envolvidos na catarata, propondo assim, uma possível predisposição sexual da doença. Segundo Sun et. al (2000), camundongos machos e fêmeas e portadores de catarata induzida por aplicação de TGF-beta foram avaliados para verificar a influência sexual, através da expressão de genes relacionados aos processos celulares ocorridos na lente dos animais. O estudo determinou três padrões de expressão: diferença entre sexos, entre os tratados com TGF-beta e controle e, relação entre sexos quanto à presença do TGF-beta. O primeiro revelou diferença na expressão da proteína γ B-cristaliniana que é encontrada abundantemente na lente. Observou-se, ainda, que machos e fêmeas ovariectomizadas apresentavam maior susceptibilidade de desenvolver catarata induzida por TGF-beta, além de demonstrarem maior expressão de proteossoma de subunidade "Z", enzima responsável por processos de degradação de proteínas. O proteossoma "Z" pode, ainda, estabelecer uma relação entre a influência do estrógeno na catarata e mecanismos moleculares (SUN et al, 2000).

A lente atinge um alto índice de refração e transparência devido a uma concentração de proteínas específicas e uma perfeita organização fibrilar moduladas pelas proteínas cristalínias. Elas compõem entre 80 a 90% das proteínas da lente, sendo classificadas em α -, β - e γ -cristalínias, que formam duas superfamílias de proteínas: a superfamília das α - cristalínias e a superfamília das β - / γ -cristalínias (MÜLLER, WÖHLKE, DISTL, 2007).

A característica mais importante da superfamília das β - / γ -cristalinas é sua capacidade de dobradura (enovelamento de proteínas). Essas proteínas possuem duas unidades, sendo uma delas em forma de *greek-key*, conferindo-lhes alta estabilidade. Sua forma e capacidade em se dobrar permitem que a lente tenha uma elevada quantidade de proteínas empacotadas. Portanto, quando há qualquer alteração nesta composição, a desorganização fibrilar resulta na opacificação da lente (MÜLLER, WÖHLKE, DISTL, 2007).

As placas de opacificação encontradas na porção anterior da lente são compostas por células fusiformes que apresentam imunomarcagem positiva para vimentina e negativa para citoqueratina, permite inferir que tais células, embora de origem epitelial, tenham sobre processo de metaplasia. Essas estruturas apresentam, ainda, acentuada deposição de colágeno e outros componentes glicoproteicos de matriz extracelular, tais como tenascina e fibronectina. Amostras que apresentem acentuado grau de maturação dessas placas revelam reduzido número de células e maior gradiente de deposição de matriz extracelular. A cápsula de lentes acometidas pelas formações das placas, costumeiramente apresentam irregularidades na porção adjacente com alterações proliferativas da membrana basal, por vezes apresentando áreas de calcificação. Tais placas esbranquiçadas aderidas à cápsula anterior da lente em cães com cataratas crônicas (maduras ou hiperaturas), prejudicam o êxito cirúrgico de uma incisão regular da cápsula (capsulorrexe) e podem ainda ocasionar opacificação da porção posterior residual da lente, ao longo do pós-operatório (COLITZ et al., 2000).

Segundo Colitz e colaboradores (2000), há uma estreita relação entre o tempo de evolução das lesões placoides associada à formação de múltiplas camadas de células fusiformes originadas a partir do processo de metaplasia que as células epiteliais sofrem e, ainda, com a deposição de matriz extracelular e alterações na membrana basal da cápsula anterior da lente. Isto culmina com a morte dessa população celular que acabam se incorporando à matriz colágena.

A morte celular programada ou apoptose se refere a um processo fisiológico presente em diversas etapas do desenvolvimento dos tecidos, desde a formação embrionária ao controle do ciclo celular atuando, também, como forma de defesa contra patógenos em doenças gênicas. O termo ainda pode ser utilizado com a finalidade de descrever alterações morfológicas sofridas pelas células ao longo do processo, tais como condensação da cromatina, irregularidade da membrana celular, retração citoplasmática e formação de corpos apoptóticos (LEE et al., 2002).

Alternativas terapêuticas, e de cunho medicamentoso, já foram propostas para as cataratas, como, por exemplo, a utilização da superóxido dismutase e do ascorbato citrato de zinco. Todavia, estudos posteriores revelaram que tais fármacos não oferecem qualquer benefício no controle da evolução da catarata. Os efeitos da administração sobre a superfície ocular de n-acetil-carnosina em cães portadores de catarata foram estudados e demonstrou-se discreta diminuição da opacificação da lente nas cataratas maduras (WILLIAMS e MUNDAY, 2006). Zhao et al. (2015) estudaram o uso do lanosterol *in vitro* e *in vivo* e propuseram que se trata de uma molécula que diminui significativamente os agregados de proteínas lenticulares e reduz as chances de evolução da catarata, aumentando a transparência da lente. Assim, a consideraram com uma molécula chave na prevenção da doença, apontando-a como uma nova estratégia de tratamento. Porém, trata-se de medicação pouco comercializada em nosso país e cuja experiência clínica é, ainda, incipiente. Portanto, ainda é consenso que a única abordagem efetiva para o tratamento da catarata é a cirúrgica, quer seja no homem ou em animais (FISCHER, 1989; DZIEZYC, 1990; LA CROIX, 2008; RESNIKOFF et al., 2004).

A técnica de escolha para remoção da catarata é a facoemulsificação, a qual consiste na fragmentação ultrassônica da lente, com posterior aspiração do material emulsificado, por pequenas incisões que variam, em medicina veterinária, de cerca de 2,75 a 3,0mm (DAVIDSON et al., 1991; NASISSE et al., 1991; BISTNER, 1992; WILLIAMS et al., 1996; GLOVER e CONSTANTINESCU, 1997).

2.3 Aspectos epigenéticos da catarata no homem e no cão

Em humanos, a catarata relacionada à idade (CRI) é uma das principais causas de deficiência visual, sendo responsável por 47,8% da cegueira (FOSTER e

RESNIKOFF, 2005). A prevalência desta ocorrência oftálmica aumenta com a idade e está intimamente associada ao aumento da expectativa de vida da população global.

Embora os meios pelos quais ocorram a CRI não sejam ainda bem elucidados, sabe-se que o dano ao DNA por espécies reativas de oxigênio (ROS) é tido como um fator importante para a sua formação; e seus reparos são essenciais para manter a transparência da lente (OTTONELLO et al, 2000). Algumas pesquisas foram conduzidas para investigar a associação entre genes de reparo de DNA e a etiologia da CRI (PADMA et al., 2011; LUO et al. 2011; ZHANG Y et al, 2012). Estudos anteriores demonstraram, também, que as variações do número de cópias polimórficas e cópias do gene *WRN* de reparo do DNA podem estar envolvidas na patogênese da CRI na população chinesa (JIANG et al., 2013). Os resultados obtidos induziram a novos estudos sobre a expressão e regulação de genes de reparo do DNA na patogenia desta ocorrência.

A regulação epigenética é o principal mecanismo, pelo qual os padrões de expressão gênica podem ser modificados, sofrendo influências do estímulo ambiental sem mudanças na própria sequência de DNA (JAENISCH et al., 2003). A metilação do DNA da região promotora, constituiu-se na modificação epigenética mais estudada, sendo um processo bioquímico reversível envolvendo a adição de um grupo metil, principalmente às citosinas (BERNSTEIN et al., 2007). Quando metilados, os cromossomos se estabilizam com a diminuição da atividade e a redução da expressão gênica (NAKAO, 2001; BAYLIN et al, 2001). A hipermetilação do DNA nos dinucleotídeos CpG pode ser induzida pelo dano do DNA (WACHSMAN, 1997). Os ROSs podem aumentar o *Snail*, que recruta a histona desacetilase-1 e DNA metiltransferase-1, levando a hipermetilação do promotor do DNA (LIM et al., 2008). Estudos recentes indicaram que a metilação do DNA regula a expressão da proteína estrutural CRYAA nas células epiteliais das lentes de pacientes com CRI (ZHOU et al., 2012).

Outros estudos foram formulados envolvendo a metilação de DNA. Li et al. (2014) intentaram avaliar se a expressão de genes de reparo de DNA era diferente em células de epitélio de lente (LECs) de pacientes com CRI e lentes normais. Avaliaram, ainda, se as alterações eram reguladas pela metilação do DNA. Concentraram-se a avaliar as LECs, devido ao seu papel no centro das atividades metabólicas desta estrutura de refração (WORGUL et al.,

1989). Concluíram, que o reparo do DNA é fundamental para manter a transparência das lentes, e que a expressão alterada dos genes de reparo do DNA está associada à patogênese do CRI. Destacaram, ainda, que a expressão do gene *MGMT* de reparo do DNA pode ser controlada, em parte, pela metilação da região promotora e o elegeram como um gene candidato promissor a ser estudado para melhor compreender a causa da catarata relacionada à idade (CRI).

No entanto, existem outros mecanismos de regulação epigenética, tais como remodelação nucleossomal, modificação de histonas, *looping* de cromatina e os RNAs não-codantes (long-non-coding RNA e microRNA).

Os miRNAs se caracterizam por uma fita simples de RNA composta por 18 a 25 nucleotídeos que se ligam à região do RNAm no sentido 3', regulando a ativação ou supressão de genes. Devido às pequenas regiões de 7 a 8 nucleotídeos do RNA serem complementares às ligações, um único *miRNA* pode se ligar a centenas de RNAm-alvos, formando um complexo regulatório dos mecanismos celulares de diferentes células. (GEBTER E MACRAE, 2019)

Em olhos de murinos foram identificados alguns *miRNAs* (RYAN et al., 2006; KARALI et al., 2007) e entre eles elencam-se: miR-184, miR-205, miR-26a, miR-31 e miR-24 que foram detectados na córnea; miR-184, miR-125b, miR-31, miR-204, miR-26a, let-7b que foram detectados na lente e, por fim, miR-181a, miR-125b, miR-124a, miR-30c, miR-182 e miR-183 que foram relatados como expressos na retina. No entanto, os perfis de expressão de *miRNAs* em lentes de espécies domésticas como o cão e, também, no homem continuam a ser estabelecidos. Identificam-se poucas pesquisas com a finalidade de se determinar os perfis de expressão de *miRNA* nas cataratas. Wu et al (2012) determinaram os perfis de expressão de *miRNA* no epitélio central de lentes humanas transparentes e com catarata, por meio de *microarray*. Da mesma forma, nesta pesquisa, optou-se em conduzi-la, utilizando-se pools de fragmentos da cápsula anterior da lente, a fim de se obter um quantitativo de RNA suficientes, similarmente ao encontrado em nosso estudo piloto. Previamente, extraímos RNA de forma individual, no entanto, as quantidades foram insuficientes para o estudo proposto.

Sendo assim, destaca-se que a identificação de *miRNAs* em células do epitélio da lente humana e murinos revela uma alta probabilidade de se encontrar resultados

similares em amostras obtidas a partir de lentes de cães, haja vista que esta espécie é comumente utilizada como modelo animal para o estudo de outras doenças humanas. Ainda, é possível presumir, que não apenas fatores epigenéticos estejam envolvidos no processo cataratogênico, tal como a metilação de DNA mas, que outros possam participar da etiopatogenia da doença, como a expressão diferencial de miRNAs. Portanto, é inegável e se torna imperativo estudá-los em cães portadores de catarata. Ressaltamos, ainda, que este é primeiro estudo desta natureza e que possibilitará identificar novas vias biológicas envolvidas na catarata canina, bem como sinalizar possibilidades terapêuticas no controle da ocorrência e progressão da doença com terapias gênicas.

Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi o de identificar os *miRNA* que apresentassem níveis de expressão distintos em cataratas imaturas e maduras em cães em comparação às lentes transparentes e sadias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Ressalta-se que os cuidados bioéticos, relativamente às normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology - ARVO (National Institutes of Health Publications No 85-23: Revised 1985)*, foram rigorosamente obedecidos, apesar do material (cápsula anterior da lente) a ser colhido para as análises ser, quase sempre, descartado. Foram submetidos ao procedimento cirúrgico pacientes atendidos junto ao Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário da UNESP – campus de Araçatuba e, todos os proprietários foram informados de todos os procedimentos experimentais sob um “Termo de consentimento livre e esclarecido”.

3.2 Pacientes: cães

Foram triados cães, machos ou fêmeas, portadores de catarata senil, atendidos no Serviço de Oftalmologia do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira”, da FMVA - Unesp, campus de Araçatuba, que foram submetidos ao exame físico geral e exame oftálmico com diagnóstico clínico inicial de catarata madura e imatura. Entre eles, selecionou-se 45 pacientes para uniformização e composição dos grupos de estudo. Foram escolhidos somente aqueles entre seis e oito anos de idade, com cataratas imaturas e maduras, sem afecções concorrentes ou sequelas de inflamação. Para a avaliação das condições clínicas gerais, os pacientes foram submetidos exame físico geral, contagem global de células sanguíneas, avaliação das funções hepática e renal e a glicemia, para atestarem a saúde dos pacientes.

Todos os animais selecionados e incluídos no estudo passaram por exame oftálmico baseado nos testes dos reflexos, no teste da lágrima de Schirmer (Teste de Schirmer – Ophthalmos, São Paulo, Brasil), na biomicroscopia com lâmpada em fenda (Lâmpada de Biomicroscopia, FL-15, KOWA, Japão), na gonioscopia (Koeppe Medium Diagnostic Lens 18mm – Ocular Instruments Inc., USA) em córneas previamente dessensibilizadas com proximetacaína 0,5% (Anestalcon – Alcon Laboratórios do Brasil Ltda); Ademais, os pacientes foram submetidos a oftalmoscopias binocular indireta (OHC – 3.3 – Opto Eletrônica S.A., São Carlos, SP, Brasil) e monocular direta (Monocular Ophthalmoscope, Welsh-Allyn, EUA) quando possível, à tonometria de aplanção (Tonopen XL – Mentor Inc, Norwell) e o teste de

tingimento pela fluoresceína sódica (Fluoresceína strips - Ophthalmos, São Paulo, Brasil).

Os pacientes que seguiram os critérios supracitados para o presente estudo, foram submetidos, ainda, à ultrassonografia ocular (UltraScan Imaging System – ESAOT) em modos A e B, e eletrorretinografia (Retinographics BPM-300, USA) segundo o *Dog Diagnostic Protocol*, descrito por Narfström et al. (2002), a fim de se excluïrem doenças do vítreo e da retina, respectivamente. A **Figura 1** ilustra dois dos pacientes sendo submetidos ao exame de eletrorretinografia prévia à facoemulsificação.

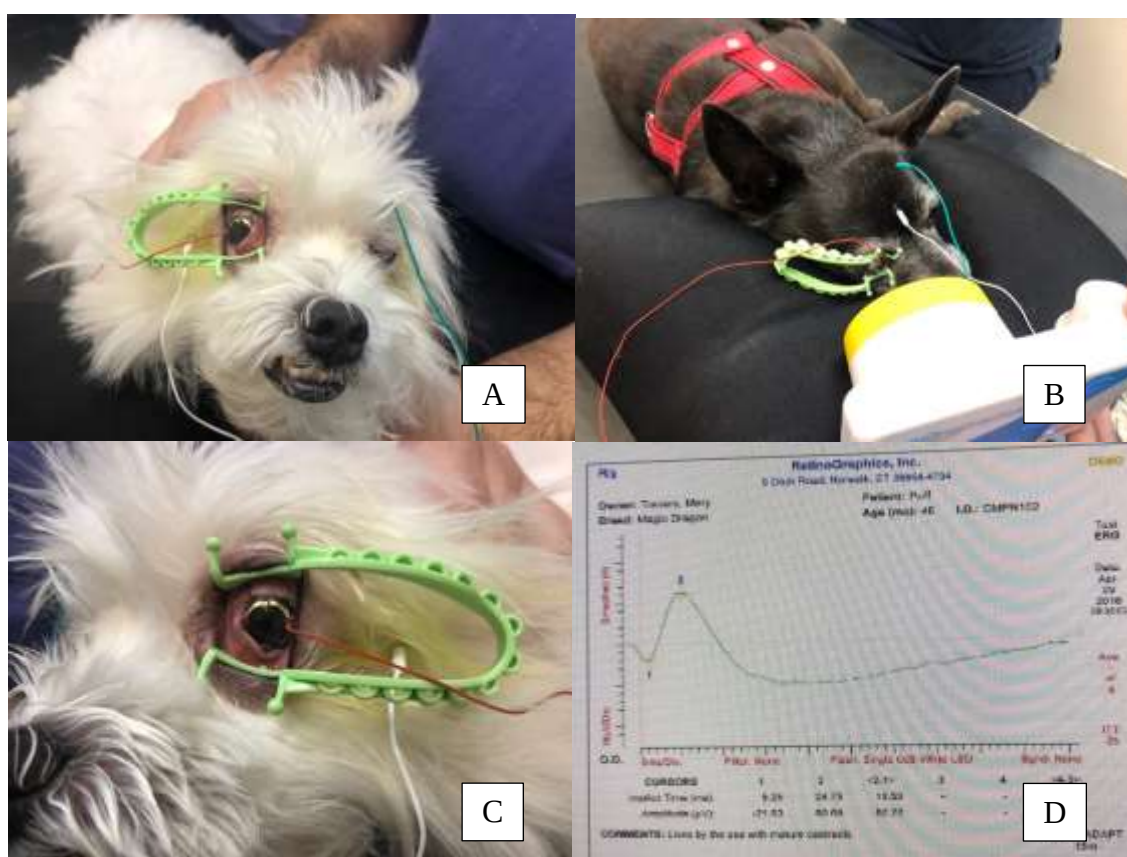


Figura 1 – Imagens fotográficas de cães submetidos ao exame de eletrorretinografia, utilizando-se o equipamento BPM-300 (*RetinoGraphics*®). (A) visão frontal dos eletrodos em paciente com catarata imatura (Malês, F, 7 anos de idade); (B) Visão do equipamento manual portátil em exame em paciente com catarata (Pinscher, F, 8 anos); (C) detalhe do blefarostato plástico e eletrodos e (D) traçado eletrorretinográfico de paciente com catarata imatura em padrão normal com formação de onda-a (a partir do eixo da diretriz até 1) e onda-b (de 1 a 2) na imagem. Nota: O programa computacional *RetinoGraphics*® comandou o número de apresentações e a duração dos estímulos luminosos, sendo utilizado o protocolo da “Internacional Society for Clinical Electrophysiology of Vision” (ISCEV) (McCULLOSH et al., 2015).

Com base nos resultados desses exames, os animais foram finalmente catalogados como candidatos à cirurgia.

Foram formados dois grupos de estudo, cujo fragmento da cápsula anterior da lente foi colhido durante o procedimento de capsulorrexe, em condições que serão descritas a seguir. Os grupos receberam denominações como: **Grupo Imatura**, composto por 15 cães portadores de catarata imatura e **Grupo Madura**, constituído por 15 cães portadores de catarata madura. Para ambos os grupos foram constituídos três *pools* contendo cinco cães cada.

Outros onze fragmentos da cápsula anterior também foram colhidos de animais de mesma idade sem catarata e livres de doenças infectocontagiosas e, assim como os grupos de estudo, agrupados em *pools* de cinco, três e três amostras. Entre eles, tornaram-se candidatos àqueles, vítimas de eutanásia humanitária ou que vieram à óbito por trauma emergencial junto ao ambulatório. Estes constituíram o **Grupo Controle**. Para minimizar variáveis de influências como as ambientais e dietárias, foram selecionados apenas cães da cidade de Araçatuba (SP) e alimentados com ração comercial de boa qualidade. O número de amostras foi determinado de modo que as análises fossem realizadas em triplicata (réplica biológica).

3.3 Procedimento cirúrgico para obtenção das amostras de tecido

3.3.1 Procedimentos pré-operatórios

Devido a maior sensibilidade e reação inflamatória apresentada pelos olhos dos cães em comparação com os olhos de humanos, faz-se necessário a adoção de protocolos pré-operatórios de preparo dos pacientes para o procedimento de facoemulsificação.

O pré-operatório teve início com sete dias de antecedência, instilando-se colírio a base de dexametasona associada à tobramicina (Tobradex® - Alcon, São Paulo), a intervalos regulares de 6 horas. Empregou-se colírio de sulfato de atropina a 0,5% (Atropina 1% - Allergan Produtos Farmacêuticos) em dois momentos: às doze horas e aos trinta minutos prévios ao procedimento cirúrgico. Utilizou-se flunixinina meglumina (Banamine – Schering Plough), em dose única de 1,1 mg/kg, pela via intramuscular, aos trinta minutos prévios ao ato operatório.

3.3.2 Procedimentos anestésicos

Foi instituído jejum alimentar e hídrico de doze e seis horas, respectivamente. Os animais foram pré-anestesiados com meperidina (Fentanest – Cristália), na dose de 0,005 mg/kg, por via intravenosa, associada a diazepam (Diazepamil – Hipolabor), na dose de 0,3 mg/kg. Decorridos quinze minutos, receberam a indução anestésica com propofol (Profolen – Blausiegel), na dose de 5,0 mg/kg, pela via intravenosa. Para a manutenção da anestesia, fez-se o uso do anestésico halogenado (Isoforine – Cristália), vaporizado em oxigênio, em circuito de reinalação semi-fechado. Ato contínuo, foi realizado o bloqueio peribulbar segundo descreveram Oliva et al. (2010), para obtenção de acinesia e centralização do bulbo do olho. No caso da ineficiência do mesmo, foi adotada a conduta de bloqueio seletivo neuromuscular sob ventilação assistida, segundo descreveram Dugdale et al. (2002), com o mesmo propósito.

3.3.3 Intraoperatório

Os pacientes foram posicionados em decúbito dorsal e a área operatória tricotomizada. Para a antisepsia da superfície periorbital, realizou-se o uso de solução aquosa de iodopirrolidona (Laboriodine PVPI tópico – Laboratórios Biosintética) nas pálpebras e diluída na proporção 1:1, em solução salina (Solução fisiológica – Cloreto de sódio 0,9% - Baxter Hospitalar), para a superfície ocular (SLATTER, 2005).

Após a colocação dos campos adesivos (Eye-pak – Alcon Laboratories), foi realizada a blefarostase mecânica com blefarostato de Barraker (Blefarostato de Barraker – Still inox). Na ocorrência de catarata bilateral, ocorreu a realização do procedimento no olho direito e, posteriormente, no esquerdo. (Figura 2).

A técnica cirúrgica adotada foi a de facoemulsificação bimanual empregando-se facoemulsificador (Facoemulsificador Regency 20/20 – MedPhacos) e solução salina balanceada (BSS) acrescida de 1,0 mL de epinefrina (Epinefrina – Cristália) 1:1000 e 1,0mL de heparina sódica (Heparina sódica – Ariston Ltda), com duas incisões corneais, uma principal e outra auxiliar, ambas localizadas em córnea clara a aproximadamente 1,0 mm do limbo. A principal foi tunelizada, em posição 11 horas, utilizando-se bisturi angulado 2,75 mm (Surgical knife 2,75mm – Alcon labs). A auxiliar, situada em posição 2 horas, foi confeccionada com auxílio de bisturi reto de 15 graus (Surgical knife, Alcon labs). Ato contínuo, foi injetada uma bolha de ar e a

cápsula anterior corada com 0,1mL de azul de tripano (Azul de tripan® – Ophthalmos). Foi preconizado o uso dos viscoelásticos sulfato de condroitina 4% e hialuronato de sódio 1% (Viscoat – Alcon labs), seguido de hialuronato de sódio a 1 % (Provisc – Alcon labs), em técnica de “soft-shell” proposta por Arshinoff (1999). Foi utilizada a capsulorrexe circular contínua com auxílios de tesoura de Vannas e pinça de utrata, da qual foram obtidos os fragmentos da porção central da cápsula anterior de cada lente, nosso objeto deste estudo. Ato contínuo e empregando-se o *prechopper* de Agahoshi (Prechopper Agahoshi – Storz Instruments, EUA), inserido pela incisão de trabalho, realizou-se a nucleodissecação, por fraturas perpendiculares entre si, adotada na técnica de “Dividir e Conquistar”. Com a hidrodissecação posterior, foi promovida a expulsão de parte do viscoelástico e a projeção dos quatro quadrantes da lente, visando à facoemulsificação do núcleo. Durante o procedimento foi utilizado um manipulador de núcleo, visando à contrapressão junto à ponteira, de forma a facilitar a emulsificação e, conseqüente, aspiração.

Os restos corticais foram aspirados, bem como o remanescente dos viscoelásticos em manobra de I/A (Irrigação e Aspiração). Findadas as etapas, foi realizada a sutura da incisão principal da córnea com dois pontos simples separados, não transfixantes e nós sepultados, utilizando-se fio mononylon 9-0 encastado (Mononylon 9-0 – Ethicon). O mesmo foi executado na incisão auxiliar. Foram implantadas lentes intra-oculares (Hafis, EUA) ou não no saco capsular gerando, portanto, a condição pseudofascia. Na existência de complicação transcirúrgicas, as mesmas não foram implantadas. A **Figura 2** mostra a sequência cirúrgica da facoemulsificação bimanual, a qual todos os pacientes foram submetidos.

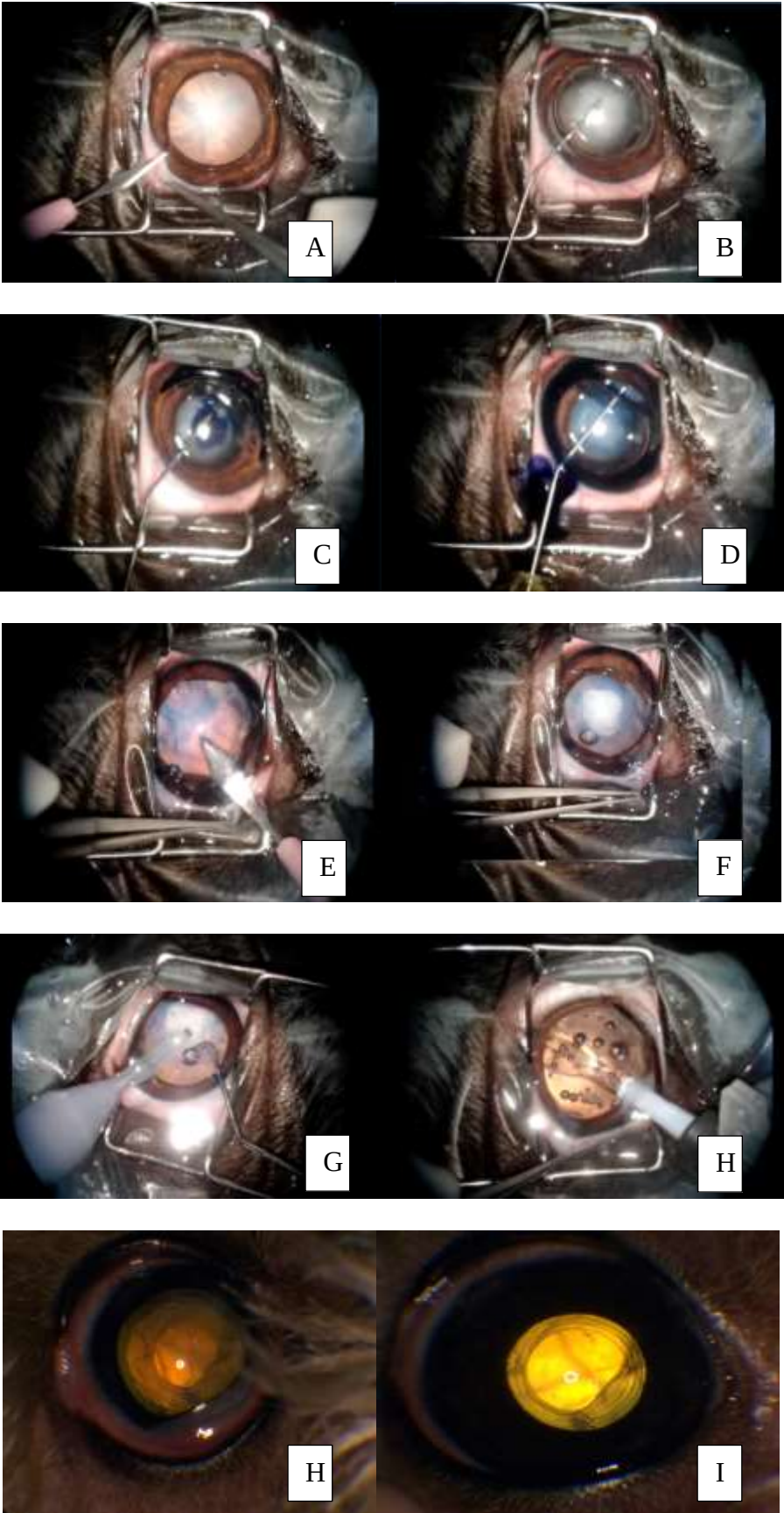


Figura 2 – Imagens fotográficas referentes ao procedimento de facoemulsificação de um cão com catarata imatura (Fêmea, 7 anos). (A) incisão auxiliar; (B) injeção de bolha de ar; (C) injeção de azul de tripano para colorir a cápsula anterior; (D) injeção na câmara anterior de substância viscoelástica (coesivo – metil-celulose) para manutenção da câmara anterior, subsequente à aplicação da substância viscoelástica dispersiva (hialuronato); (E) incisão de trabalho usando bisturi de 2.75; (F) capsulorrexe concluída (etapa em que os fragmentos foram colhidos); (G) facoemulsificação; (H) introdução da lente intraocular (LIO) e (H e I) Pós-operatório imediato.

Durante a cirurgia de facoemulsificação, após término da etapa de capsulorexis, o fragmento da cápsula anterior removido foi acondicionado em um *eppendorf* livre de DNA e RNA, e imediatamente imerso em nitrogênio líquido para congelamento rápido e, conseqüentemente, estocado em freezer à -80°C até processamento (**Figura 3**).

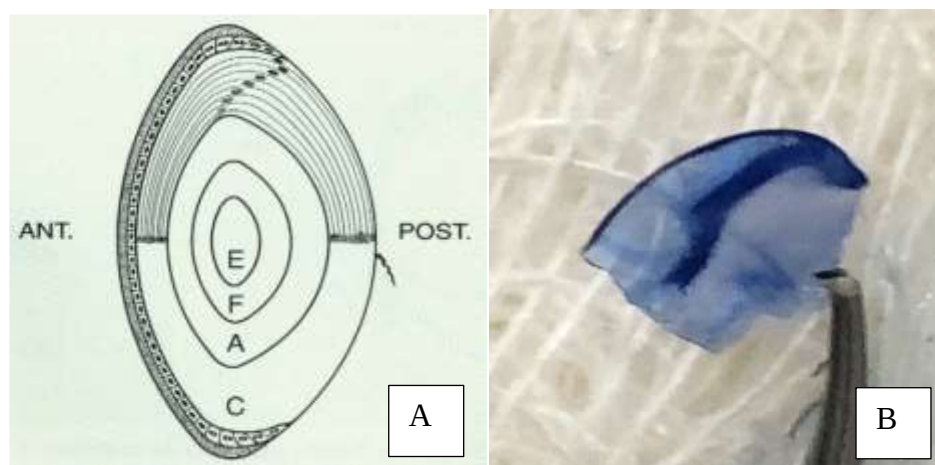


Figura 3 – Representação esquemática da lente. **A)** Imagem do corte sagital da lente sob esquema identificando suas estruturas: ANT: cápsula anterior da lente; POST: cápsula posterior da lente; E, F, A: núcleo da lente e C: córtex da lente. Observar abaixo da cápsula anterior da lente, camada unicelular que se estende até a região equatorial da lente (limite entre a cápsula anterior e posterior). **B)** Fragmento de lente de cão corado por azul de tripano, após manobra de capsulorrexe, na facoemulsificação.

3.3.4 Procedimentos pós-operatórios

Administrou nos animais prednisona (Meticorten 20mg, Vetnil, São Paulo.), por via oral, na dose de 1,0mg/Kg, a intervalos de 24 horas, por 15 dias consecutivos, com redução gradual posterior da dose nos 15 dias subsequentes; dexametasona associada à tobramicina (Tobradex®, Alcon, São Paulo), a cada 4 horas por 7 dias e a seguir a cada 6 horas, por mais 21 dias; brinzolamida a 1% (Azopt®, Alcon, São Paulo) a intervalos de 12 horas, por 7 dias, além de atropina a 0,5% (Atropina 0,5%®, Alcon, São Paulo), a cada 12 horas, por 5 dias consecutivos. Todos os pacientes foram mantidos com colar do tipo Elizabethano por, no mínimo, 30 dias e avaliados quanto aos parâmetros clínicos oftalmológicos quanto à evolução pós-operatória.

3.3.5 Extração do RNA a partir de fragmentos de cápsulas anteriores da lente

Quanto ao processamento das amostras ao que propusemos neste trabalho, informamos que o mesmo ocorreu em duas etapas: 1) a extração do RNA a partir de amostras individualizadas conforme proposto no projeto original e 2) extração do RNA a partir de “pool” de amostras (n=5) de cada grupo, considerando que a primeira, revelou resultados não condizentes ao que é necessário para ao que se propõe nesta pesquisa, quanto ao quantitativo de RNA extraído.

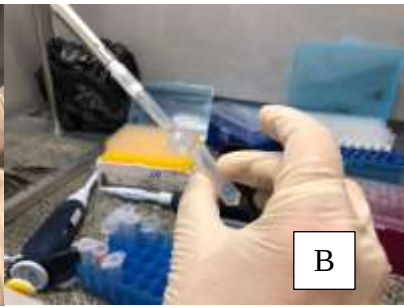
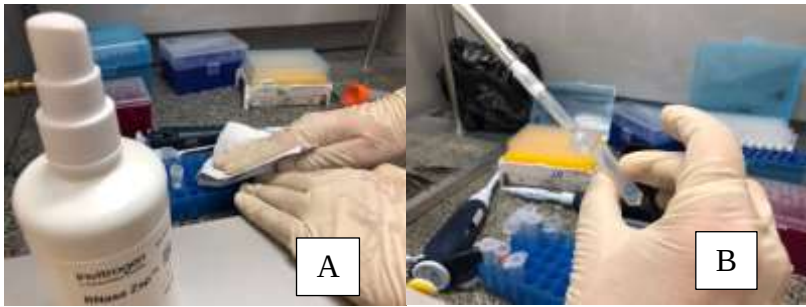
Para tanto, abaixo seguem a metodologia aplicada para ambas situações, na extração do RNA, que foi realizada, utilizando-se o kit *mirVANA miRNA Isolation kit* (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante.

Iniciou-se o preparo do material em capela de fluxo contínuo, com a limpeza de qual material a ser utilizado com o RNA Zap, que exime a contaminação das amostras com outro material genético, garantindo resultados fidedignos quanto à leitura de material extraído. Ato contínuo, introduziu-se 500µl de tampão de lise nos tubos em que as amostras foram acondicionadas. Cada tubo foi submetido à homogeneização e fragmentação das amostras, para que houvesse a soltura das células epiteliais da lente da cápsula anterior. Em seguida, adicionou-se aos tubos 50µl de *miRNA homogenate additive*. Sob estas condições os tubos ficaram em descanso durante dez minutos sob refrigeração (em gelo). Ato contínuo, foi introduzido a cada tubo 500µl de Fenol clorofórmio em volume igual ao volume original do lisado antes de se

adicionar o homogenato. Após tal manobra, os tubos foram agitados em vórtex durante 60 segundos. Em seguida, os tubos foram acondicionados em centrífuga (Eppendorf®) e, procedeu-se a centrifugação durante cinco minutos, a uma rotação de 10.000rpm. O sobrenadante foi removido de cada tubo e introduzido em um novo tubo limpo (livre de DNA e RNA). O volume obtido de cada tubo foi calculado e, a ele foi introduzido 1,25 volumes de etanol para uso em biologia molecular. Tal volume variou entre 700µl para as amostras que foram processadas individualmente, e de 875µl para as amostras processadas em “pool”. Em seguida, as misturas foram introduzidas em tubos de coluna por 15 segundos, em volume máximo de 700µl por vez. Este volume se refere a capacidade máxima que cada tubo suporta por vez.

Ato contínuo, procedeu-se o processo de lavagens que foram conduzidas da seguinte forma: 1) introdução de 700µl da solução do kit de extração (Wash 1), seguida da centrifugação durante dez segundos (10.000 rpm). O volume do fundo do tubo de coluna foi descartado de forma apropriada. Em seguida, foi introduzido 500µl da solução “Wash 2/3” do kit de extração aos tubos de coluna. Os mesmos foram centrifugados mais uma vez, durante dez segundos, na mesma rotação. O processo foi repetido mais uma vez sob mesmas condições. Por fim, o filtro do tubo foi acondicionado em novo tubo e o material ao fundo do tubo foi desprezado. O tubo foi centrifugado durante um minuto (10.000 rpm), e então foi procedida a eluição, introduzindo-se 30µl de H₂O ultra-pura livre de DNA e RNA aquecida à 95°C. O tubo foi, por mais uma vez, centrifugado na rotação máxima da centrífuga por 30 segundos e introduzido em um compartimento contendo gelo.

Para leitura da (s) amostra (s), obteve-se 1µl de cada um dos tubos com auxílio de pipeta milimetrada, e procedeu-se a espectrofotometria no NanoDrop® (Roche) para obtenção dos valores numéricos da quantidade de RNA extraído nas amostras individualizadas e/ou “pool” de amostras. A **Figura 4** apresenta imagens alusivas ao processamento.



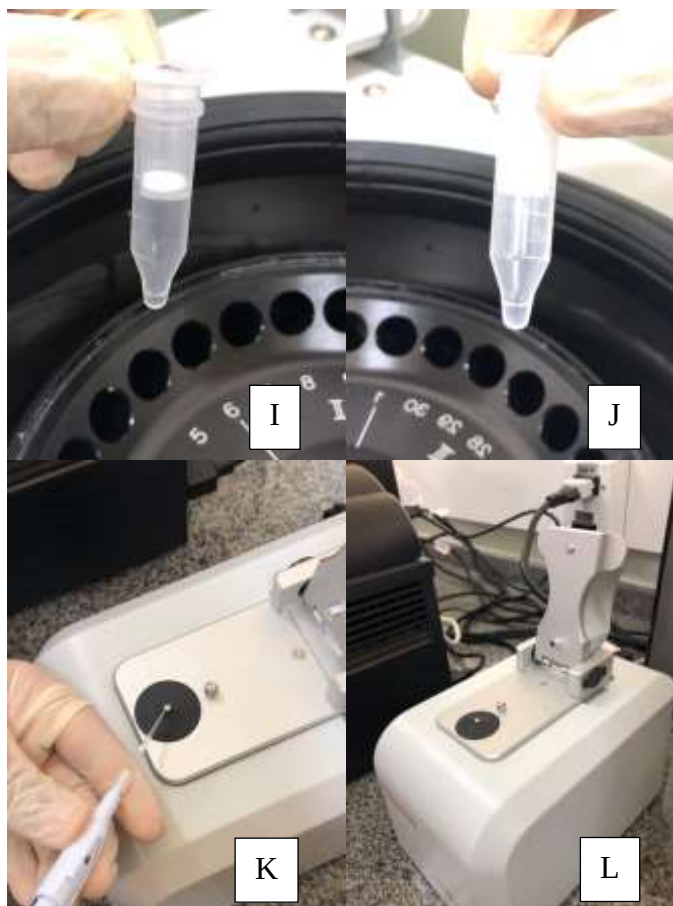


Figura 4 – Imagens fotográficas alusivas ao processamento das amostras (cápsula anterior da lente) obtidas a partir de capsulorrex curvilinear na facoemulsificação de cães portadores de catarata. Etapas de extração do RNA utilizando o kit de extração *mirVANA miRNA Isolation kit* (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. (A) limpeza de todo material e bancada da capela de fluxo; (B) manobra de embebição da amostra com o tampão de lise; (C) amostra embebida pelo tampão de lise. Notar a cápsula colhida impregnada pelo azul de tripano; (D) pipetagem de 50 μ l de *miRNA* homogenato (reagente do kit de extração); (E) Homogeneização da amostra diluída em tampão de lise no homogeneizador; (F) amostra sendo submetida à mistura em vórtex por 60 segundos, em meio à 500 μ l de fenol clorofórmio; (G) mistura composta de sobrenadante diluído em 1,25 volumes de etanol do valor em μ l do sobrenadante; (H) amostras acondicionadas na centrífuga; (I) preparo para centrifugação do filtro da coluna para obtenção do RNA extraído em suspensão ao meio de lavagem “wash 2/3”; (J) amostra eluída em H₂O ultra-pura e preparada para leitura no NanoDrop®; (K) pipetagem de 1 μ l do composto de extração no leitor do NanoDrop® (espectrofotometria) (L) imagem do NanoDrop®.

3.4 Análise transcriptômica (miRNAs)

Para análise transcriptômica, utilizou-se os *GeneChip™ mirna 4.1 Array Strip* (Affymetrix®) (**Figura 5**) seguindo as orientações de protocolo do fabricante. Este ensaio permite a análise global do transcriptoma da espécie canina.



Figura 5 – Imagem representativa do strip GeneChip™ miRNA 4.1 Array Strip (Affymetrix®) utilizado para análise global de microRNAs.

Após descongelamento das amostras de cada grupo constituídas em *pool*, elas foram identificadas, hibridizadas, e escaneadas no equipamento *GeneAtlas* (Affymetrix®). Após normalização dos resultados com o programa *Expression Console* (Affymetrix®), o programa *Transcriptome Analysis Console (TAC)* (Affymetrix®) foi utilizado para a análise da expressão diferencial dos *miRNAs*, cuja análise estatística empregada foi o teste ANOVA com correção do *p*-valor por Benjamini-Hochberg - FDR, para análises múltiplas.

Em seguida, os dados foram incluídos no programa *Kyoto Encyclopedia of genes and genomes (KEGG)*, *Wikipathway* e *TargetScan* para análise ontológica e enriquecimento de vias biológicas.

3.4.1 Análise estatística dos resultados da expressão global de miRNAs

Os dados experimentais de validação foram analisados usando o “Least Squares Analysis of Variance” - General Linear Model Procedures do SAS (Cary, NC), seguido de análise *post-hoc* de médias (Bonferroni, Duncan e Tukey). As variáveis dependentes e independentes foram estabelecidas de acordo com o delineamento experimental específico. Os modelos estatísticos usados para os experimentos continham os efeitos principais e todas as possíveis comparações: 1) controle X imatura; 2) controle X madura; e 3) imatura X madura.

4 RESULTADOS

Em estudo piloto e considerando os dados literários, intentou-se realizar a extração de RNA individualmente e em *pool*, a fim de comparação quanto aos resultados obtidos. Desta forma, observou-se que, a partir de amostras individuais, a quantidade de RNA extraído era insuficiente para as análises propostas na pesquisa, uma vez que a fabricante do kit de extração recomenda que as amostras contenham, no mínimo, um total de 130ng de RNA total. Portanto, optou-se em agrupar as amostras em *pools* de cinco fragmentos de cada tipo de catarata, bem como as amostras controles. Os resultados da quantidade de RNA extraído no estudo piloto são apresentados no **Quadro 1**.

Quadro 1 – Dados referentes às amostras colhidas para o estudo e processadas para extração de RNA de forma individual e em *pool* de dois grupos (imatura, madura e controle).

(continua)

Amostra	RG/HV	Nome	Idade	Raça	Tipo de Catarata	OD	OE	Quantitativo de RNA extraído
Amostras processadas individualmente								
1	48648	Zaira	8 anos	Chow-Chow	Madura	-	X	6,9 ng/μl
2	48493	Mel	6 anos	Poodle	Madura	X	-	2,3 ng/μl
3	49383	Wendy	7 anos	Ilhasa Apso	Madura	-	X	22,0 ng/μl
4	53793	Didi	6 anos	Poodle	Imatura	X	-	2,6 ng/μl
6	47191	Bebê	8 anos	Pinscher	Controle	X	-	27,0 ng/μl
"Pool" processadas em amostras								
7	49383	Didi	6 anos	Poodle	Imatura	X	-	23,2 ng/μl (<i>pool</i>)
8	58812	Radija	6 anos	Schitzu	Imatura	X	-	
9	59455	Romeu	6 anos	Bulldog Francês	Imatura	X	-	
10	49132	Jhuly	6 anos	Poodle	Imatura	-	X	
11	45955	Raulf	7 anos	Poodle	Imatura	-	X	
12	51879	Morena	8 anos	Labrador	Controle	X	-	72,9 ng/μl (<i>pool</i>)
13	51879	Morena	8 anos	Labrador	Controle	-	X	
14	-	-	7 anos	Labrador	Controle	X	-	
15	-	-	7 anos	Labrador	Controle	-	X	
16	52345	Pantera	6 anos	SRD	Controle	X	-	

Quadro 1 – Dados referentes às amostras colhidas para o estudo e processadas para extração de RNA de forma individual e em *pool* de dois grupos (imatura, madura e controle).

								(conclusão)
17	53788	Nick	6 anos	SRD	Madura	X	-	59,7 ng/ μ l (<i>pool</i>)
18	59888	Marlon	7 anos	Poodle	Madura	X	-	
19	45666	Pituca	8 anos	Poodle	Madura	-	X	
20	58765	Lindeza	6 anos	YorkShire	Madura	X	-	
21	56785	Thor	6 anos	Poodle	Madura	X	-	

Observa-se que das amostras processadas individualmente (#1 a #6), a quantidade de RNA extraído foi inferior à quantidade extraída em “*pool*”. A obtenção de quantidades ínfimas de RNA, que sejam processáveis em estudo desta natureza, pode ser justificada primeiramente, porque as células epiteliais da lente, que estão dispostas na face posterior da cápsula anterior, em um tapete único, constituam um arsenal celular pequeno, sendo razoável inferir que, extrair DNA e RNA destas células se constitua em um desafio. Outro fato relevante é que no processo cataratogênico há perda destas células com a evolução da catarata por apoptose, além do fato de que elas possam migrar para a cápsula posterior. Adjutoramente, estas células podem ter seu fenótipo alterado, que pode ser mediado por alterações no material genético (ZACHARY, 2017). Sendo assim, optou-se em conduzir o processamento das amostras sob a forma de “*pools*” de cinco amostras em cada grupo, conforme realizaram Wu et al. (2012) que reportaram pelo mesmo problema ao tentarem extrair RNA das células epiteliais da lente de pacientes humanos.

Ressaltamos que o processamento das amostras em *pool* foi conduzido em triplicata para cada grupo, com intenção de minimizar possíveis variações causadas pela agregação de amostras individuais. Informamos que os resultados obtidos no estudo piloto de extração, as amostras #7 a #11 (imatura), #12 a #16 (controle) e # 17 a #21 (madura) (**Tabela 1**) foram aproveitadas para compor com as demais amostras colhidas. A **Tabela 1** apresenta a quantidade de RNA extraído em cada um dos *pools*.

Tabela 1 – Concentração (ng/μl) e Volume (μl) de RNA extraídos nos *pools*, a partir de fragmentos oriundos da capsulorrexe da cirurgia de facoemulsificação de cães portadores de catarata imatura, madura e lentes normais.

	Grupo	Número de Amostras em cada pool	Concentração de RNA (ng/μl)	Volume (μl)
Pool Controle	Controle 1	5	72,9	29,0
	Controle 2	3	393,0	14,0
	Controle 3	3	161,3	14,0
Pool Imatura	Imatura 1	5	23,2	29,0
	Imatura 2	5	13,1	14,0
	Imatura 3	5	16,7	27,0
Pool Madura	Madura 1	5	228,8	14,0
	Madura 2	5	59,7	14,0
	Madura 3	5	22,6	14,0

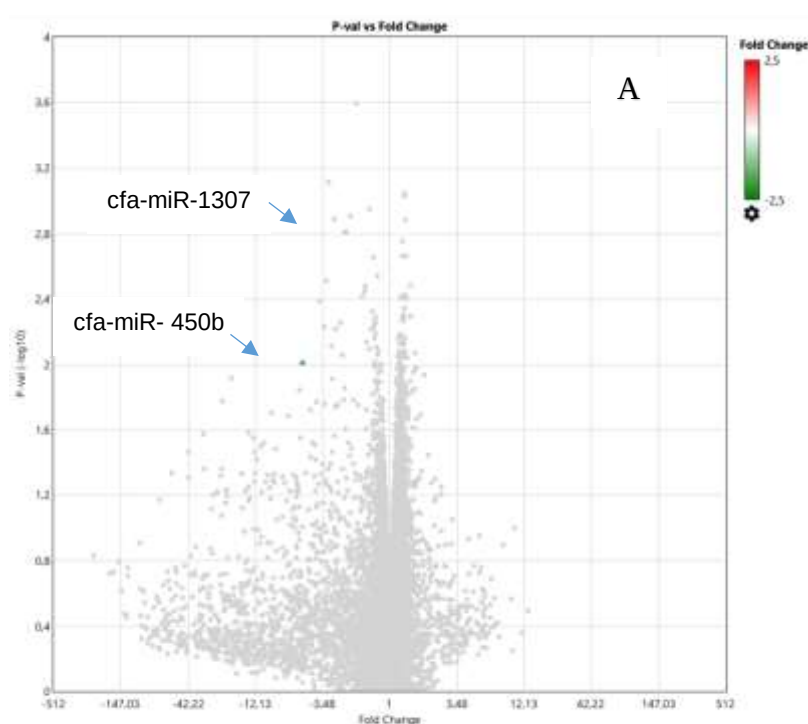
A expressão de *miRNA* em lentes transparentes (controle), cataratas imaturas e maduras foi inicialmente determinada por três ensaios de *microarrays* separados, cujos resultados apontaram não haver *miRNAs* diferencialmente expressos, ao se comparar os grupos controle e madura e os grupos imatura e madura. Porém, ao se comparar os grupos imatura e controle, foram identificados dois *miRNAs* caninos diferencialmente expressos e são eles: 1) cfa-miR-1307 e 2) cfa-miR-450b por estarem infra-regulados no grupo imatura, ou seja, menos expressos. Isto permite inferir que os mesmos estejam envolvidos como agentes nas fases iniciais do desenvolvimento da catarata no cão.

A média de expressão do cfa-miR-1307 no grupo imatura foi de $1,42 \pm 0,18$ e, no grupo controle de $2,6 \pm 0,32$ ($P=0,0016$ e *fold change* = -2,26); a média de expressão do cfa-miR-450b no grupo imatura foi de $1,19 \pm 0,89$ e, no grupo controle: $3,54 \pm 0,28$ ($P=0,0097$ e *fold change* = -5,11). A **Tabela 2** apresenta a média e desvio-padrão, *fold change* e o valor de P da expressão de *miRNAs* *infra-regulados*, na comparação dos grupos imatura e controle.

Tabela 2- Média e desvio-padrão, *fold change* e valor de P da expressão de *miRNAs* infra-regulados, quando comparados entre os grupos imatura e controle.

miRNA	Homólogo humano	Média e desvio-padrão do grupo (log2)		Fold Change	P-valor
		Imatura	Controle		
cfa-miR-1307	hsa-miR-1307-3p	1,42 ± 0,18	2,60 ± 0,32	-2,26	0,0016
cfa-miR-450b	hsa-miR-450b-5p	1,19 ± 0,89	3,54 ± 0,28	-5,11	0,0097

A **Figura 6** mostra, graficamente, a confirmação dos *miRNAs* expressos em cães portadores de catarata imatura e a inexistência de expressão diferencial entre os grupos catarata madura e controle e catarata imatura e madura. A Figura 5, representa o nível de expressão dos *miRNAs* identificados no grupo catarata imatura e grupo controle e a **Figura 7**, representando separadamente o nível de expressão dos *miRNAs* dos 3 *pools* entre o grupo catarata imatura e grupo controle.



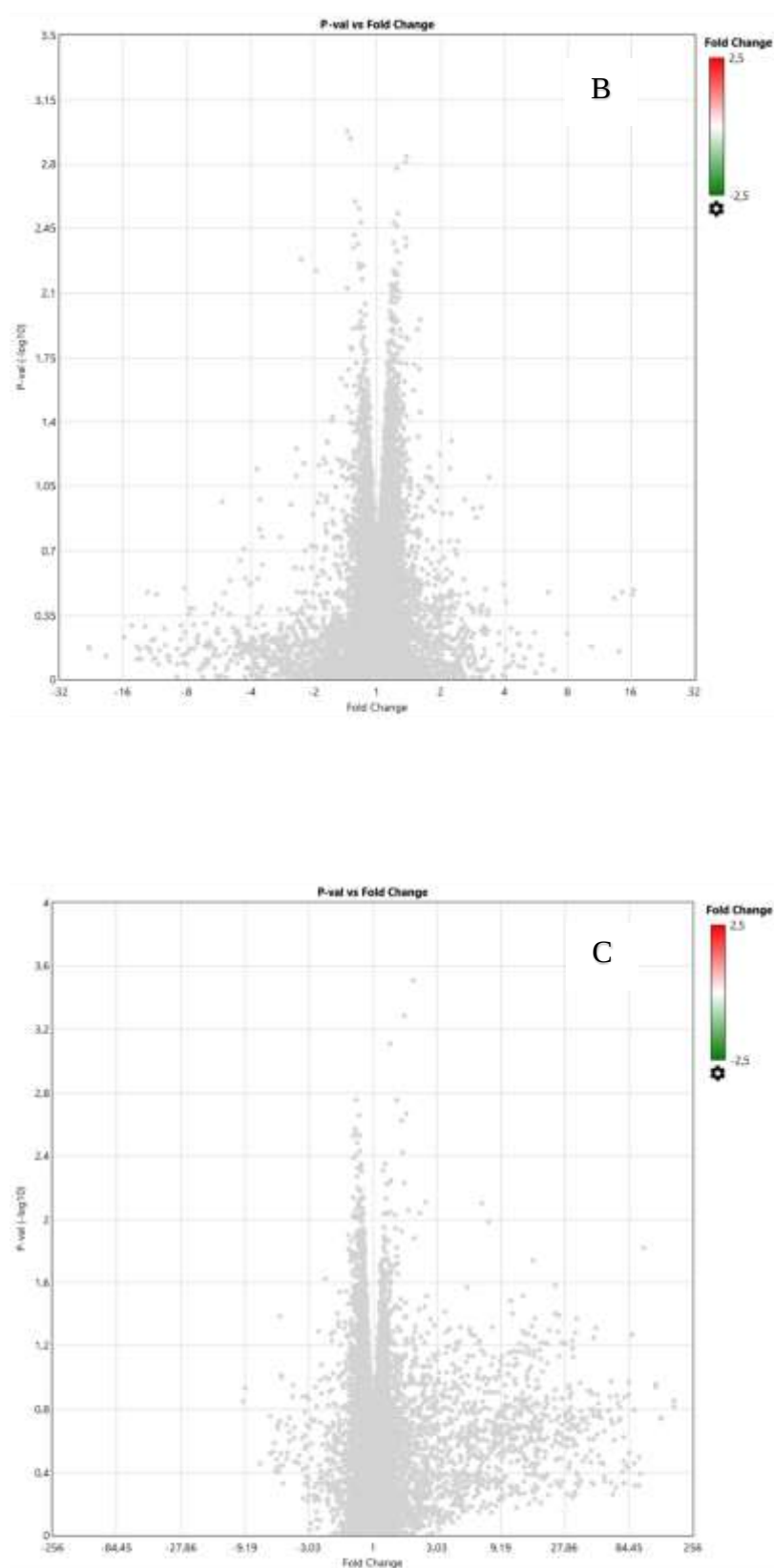


Figura 6 - Gráfico de Volcano (valor de P x *fold change*) da expressão dos *miRNAs* quando comparados entre os grupos. A) Os dois pontos verdes representam graficamente os *miRNAs* infra-regulados, sendo: **cfa-miR-1307** ($P=0,0016$ e *fold*

change = -2,26) e **cfa-miR-450b** ($P=0,0097$ e *fold change* =-5,11) (setas) no grupo imatura em comparação ao grupo controle; B) observa-se que não há diferença de expressão de *miRNA* entre os grupos controle e madura; C) observa-se que não há expressão de *miRNA* entre os grupos imatura e madura.

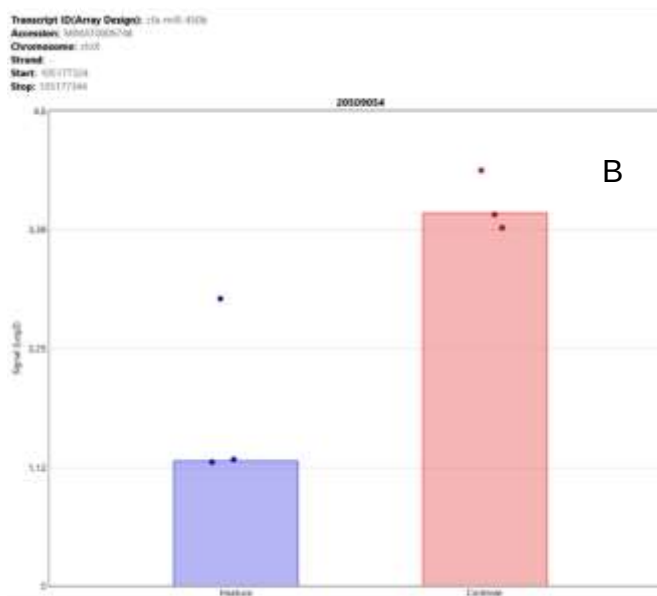
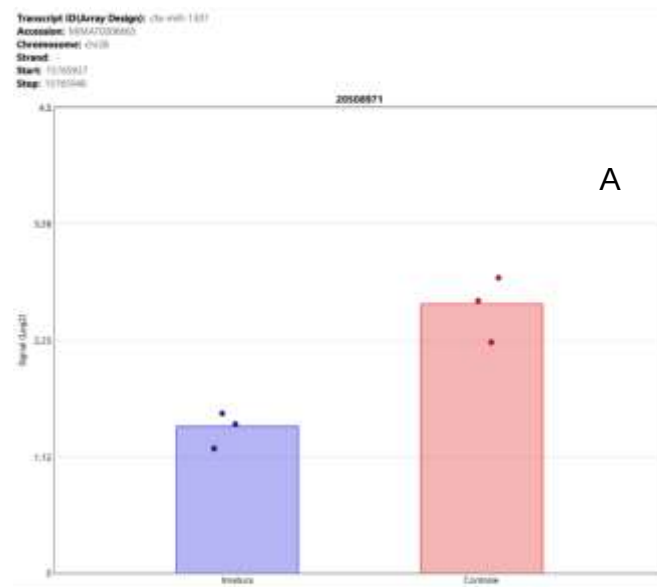


Figura 7 - A) Nível de expressão do **cfa-miR-1307** nos 3 *pools* do grupo imatura em comparação ao controle; B) Nível de expressão do **cfa-miR-450b** dos 3 *pools* do grupo imatura X grupo controle.

Após consulta junto às bases de dados genômicos (miRBase), verificou-se que os *miRNAs* cfa-miR-1307 e cfa-miR-450b não estão descritos e nem correlacionados com a catarata no cão, bem como nenhum outro *miRNA* para esta doença, o que nos permite inferir de que se trata da primeira descrição de *miRNAs* envolvidos na catarata no cão. No entanto, ao se realizar o estudo de homologia com a espécie humana, foi possível identificar possíveis funções e vias metabólicas envolvidas na doença, dada à alta conservação do genoma entre as espécies (**Figura 8**). Os ortólogos humanos encontrados nesta base foram: hsa-miR-1307-3p e o hsa-miR-450b-5p, correspondendo aos cfa-miR-1307 e cfa-miR-450b, respectivamente. Ambos *miRNAs* apresentam sequência de nucleotídeos idênticas ao seus ortólogos, que foram obtidas na base de dados online miRBase (<http://www.mirbase.org/>), e alinhadas no programa online MUSCLE 3.8 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/mas/muscle/>). Por serem ortólogos idênticos, a predição dos *miRNAs* encontrados no cão, pode ser realizada com base nos dados descritos no homem (hsa-miR-1307-3p e o hsa-miR-450b-5p), cuja lista de genes-alvos foi obtida no TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/).

Após conclusão da análise, verificou-se a apresentação de 1.695 genes alvos para o hsa-miR-1307-3p, e 5.416 genes alvo para o hsa-miR-450b-5p.

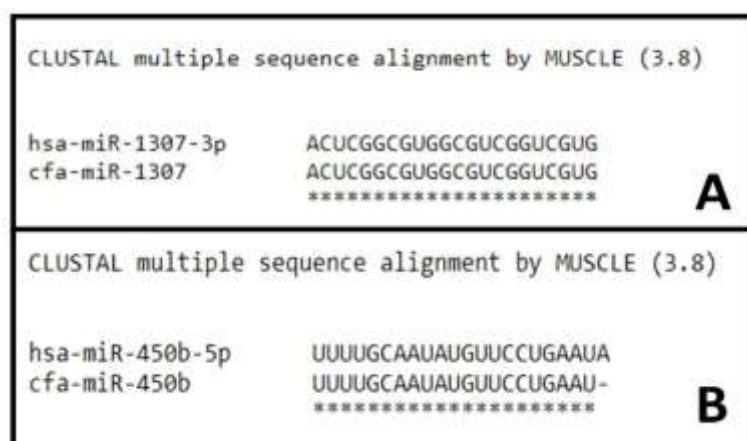


Figura 8 – Alinhamento entre os *miRNAs* caninos e seus respectivos homólogos humanos utilizando o programa online MUSCLE: A) cfa-miR-1307 e hsa-miR-1307-3p; B)

cfa-miR-450b e hsa-miR-450b-5p. Nota: Observar a homologia idêntica na sequência de nucleotídeos.

A análise comparativa de expressão de *miRNAs* entre os grupos estudados, verificou-se um padrão diferencial de expressão dos *miRNAs* infra-regulados no grupo catarata imatura em comparação ao grupo controle. A **Figura 9** mostra o *Heat map* amplificado dos padrões de expressão derivados do *microarrays*.

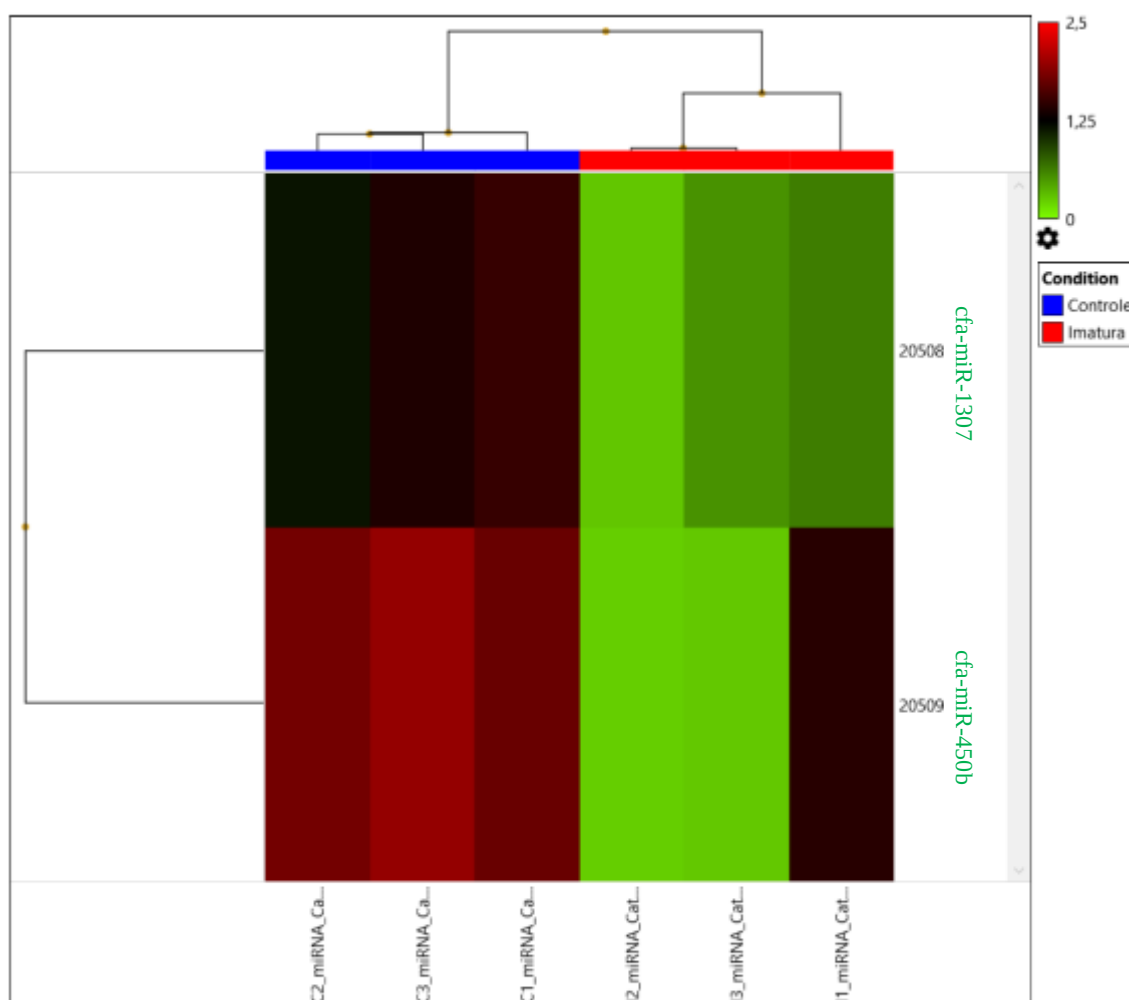


Figura 9 – *Heat map* amplificado do *miRNAs* diferencialmente expressos na análise de microarranjo do grupo catarata imatura e controle. Os autores realizaram três ensaios de *microarrays* separados para cada grupo. O valor de expressão relativa é demonstrado através do gradiente de cor de vermelho a verde onde, vermelho indica maior nível de expressão e a cor verde, menor nível de expressão de *miRNA*. As diferenças de dobra correspondem ao sombreamento de cor.

Quanto à predição de possíveis genes alvo envolvidos na catarata em cães, observou-se que os dois *miRNAs* identificados por ortologia humana na catarata imatura podem regular milhares de genes alvo, segundo as plataformas de enriquecimento de vias biológicas (*TargetScan*, *KEGG* e *WikiPathways*). No entanto, optou-se em analisar aquelas que possivelmente estivessem correlacionadas às vias

de sinal para o crescimento celular, apoptose, proliferação celular ou a regulação do ciclo celular.

5 DISCUSSÃO

Os estudos sobre *miRNAs* emergiram, recentemente, como uma classe importante na regulação de genes. Embora os *miRNAs* tenham sido identificados em muitos tipos de tecidos e órgãos de mamíferos, incluindo os olhos, o seu transcriptoma em lentes caninas permanece desconhecido. Este artigo é a primeira descrição da identificação de *miRNA* no epitélio central da cápsula anterior de lentes transparentes e cataratas imatura e madura em cães. No presente estudo, os perfis de expressão de *miRNA* em lentes caninas foram identificados através do uso de *microarrays* que detectaram dois *miRNAs* (cfa-miR-1307 e cfa-miR-450b) diferencialmente expressos em amostras de *pools* provenientes do epitélio central de lentes com catarata imatura em comparação de lentes normais, considerando um *fold change* de 2,0.

Estudos demonstram que *miRNAs* supra-regulados ou infra-regulados estão envolvidos em uma extensa variedade de neoplasias, tais como câncer de pulmão, fígado, mama, câncer gástrico, esofágico, linfomas entre outros. Mais da metade dos genes desses *miRNAs* se localizam em regiões do genoma relacionadas a processos neoplásicos ou de instabilidade (DAI et. Al, 2017; HE et. Al, 2019; PACZKOWSKA et. Al, 2021).

Zheng et. al. (2019), relataram que a expressão de miR-1307-3p (ortólogo humano idêntico ao encontrado nos cães) em pacientes portadores de câncer de cólon está relacionada ao tamanho do tumor e o grau de invasão, no entanto, não há correlação significativa quanto a outras variáveis. A taxa de sobrevivência em pacientes que apresentaram elevada expressão de miR-1307-3p era maior quando comparada em pacientes com baixa expressão. O estudo proposto pelos autores avaliou também que, *in vitro*, a expressão elevada do miR-1307-3p está relacionada à redução ou inviabilidade das células quando comparado a outro grupo que recebeu o inibidor de miR-1307-3p. Portanto, o experimento demonstrou que a habilidade de formação de colônias das células que receberam o miR-1307-3p era reduzida, ao passo que o grupo que foi transfectado com o inibidor, apresentou maior formação de colônias celulares. Assim, demonstraram claramente o efeito inibitório de proliferação e de inviabilidade celular na presença do miR-1307-3p. O mesmo pode ocorrer quanto à apoptose, também descrita neste trabalho. Através de análise por citometria de fluxo, os pesquisadores também concluíram que havia participação do miRNA

estudado na via da apoptose, correlacionando sua elevada expressão a uma maior taxa de apoptose das células neoplásicas. Possivelmente, o *miRNA* cfa-miR-1307 identificado nas cataratas imaturas possam estar regulando os genes que atuem no processo de viabilidade das células epiteliais da lente, visto que no grupo catarata madura este *miRNA* não esteve expresso diferencialmente.

Outro ponto a se destacar e que já foi descrito, trata-se da apoptose que é um mecanismo vital envolvido no controle do desenvolvimento embrionário, homeostasia celular, defesa contra agentes químicos, físicos ou biológicos e no envelhecimento. Estudos revelaram que doenças oculares estão associadas ao processo apoptótico tais como: glaucoma, retinite pigmentar, retinoblastoma, processos isquêmicos retinianos, retinopatia diabética e catarata (LEE et.al., 2002). Inegavelmente, pode-se inferir que a apoptose das células epiteliais da lente ocorre à medida que a catarata evolui havendo, assim, perda de células epiteliais, com consequente influxo desordenado de água e nutrientes na lente, tornando-a mais opacificada. Portanto, nos parece evidente que a baixa expressão do *miRNA* cfa-miR-1307 canino na catarata imatura esteja correlacionada à apoptose das células epiteliais da lente, tendo em vista que se trata de uma doença progressiva.

Com base no dado literário de que o hsa0miR-1307-3p apresentou associação à apoptose e participação no ciclo celular, objetivou-se correlacionar por meio de *Western Blot* a relação da elevada expressão de miR-1307-3p associada a expressão de p53 e ciclina D1 (proteínas com função direta na apoptose) e níveis reduzidos de ki67 (proteína atribuída a proliferação celular) descritas por Zheng et. al. (2019); o mesmo possa também ocorrer nas cataratas imaturas. Porém, avaliar genes e proteínas isoladamente por outras técnicas moleculares mais precisas não foi objeto deste estudo. Mas, tais dados do transcrito humano, sugerem evidências sobre a relação do cfa-miR-1307 (canino) com o estímulo a apoptose e inibição da proliferação celular.

A hipótese de que *miRNAs* possuem papel ativo e crucial como condutores ou silenciadores de genes relacionados a processos de iniciação e progressão neoplásica é cada vez mais evidente. O *miRNA* has-miR-1307-3p (ortólogo humano encontrado em nosso estudo) já foi identificado em neoplasias mamárias, gastrointestinais e hepáticas. Chen et. al (2019), demonstraram em seus estudos a participação deste *miRNA* no processo de crescimento e metástase em carcinomas hepáticos, promovendo maior proliferação celular, migração e invasão quando sua

expressão está elevada. O resultado sugere que hsa-miR-1307-3p infra-regulado pode realizar um papel inverso, inibindo o crescimento celular, por exemplo. Desta forma, adotando uma ação distinta ao observado por Zheng et al. (2019), cuja ação ocorre na mesma via, porém exercendo uma regulação negativa dos transcritos.

Yang et. al (2018), identificaram que o hsa-miR-1307-3p inibiu a diferenciação condrogênica de células tronco. Tais achados, demonstram com mais clareza possíveis mecanismos moleculares envolvidos na ação inibitória do ciclo celular e diferenciação das células através da ação deste *miRNA*. No referido estudo, a via de sinalização BMPR2-Smad foi marcada pelo *miRNA* hsa-miR-1307-3p. A presença de uma correlação negativa entre a expressão elevada do hsa-miR-1307-3p e a redução da expressão de BMPR2 (receptor transmembrânico com função conhecida em diferenciação de células tronco mesenquimais), comprova que o *miRNA* pode agir de modos opostos em diferentes linhagens celulares, ora incitando a proliferação, ora inibindo-a. Diante desses resultados é possível presumir que a expressão *down-regulated* do cfa-miR-1307 nas células do epitélio da lente de cães com catarata imatura esteja associada a inibição do crescimento e proliferação celulares, haja vista que, a evolução da catarata se constitui em perda de células epiteliais e substituição por miofibroblastos subcapsulares (SAIKA, 2009).

Neste estudo observou-se, também, a baixa expressão do cfa-miR-450b em amostras em *pool* de cataratas imaturas, que não foi descrito em doenças em cães. O homólogo humano, segundo à base de dados MiRBase, é o hsa-450b-5p que foi descrito como *upregulated* no sangue de pacientes portadores de tumor de pulmão (HE et. al., 2019) e diferencialmente expressos em células mononucleares sanguíneas de pacientes com vitiligo (ZHANG et. al., 2021), sendo correlacionado ao ciclo celular e apoptose. Com análise de enriquecimento de vias, foi possível estabelecer uma relação entre esse e outros *miRNAs* identificados como supra ou infraregulado, com a expressão de *RNAm*, cujas funções estão relacionadas às vias de TGF-beta, mTOR, adesão focal e via de sinalização PI3K-AKT. Essas mesmas vias possuem um papel importante na proteção, manutenção, sobrevivência e danos ao DNA, fatores também associados ao desenvolvimento da catarata em cães (OTONELLO et. al, 2000). Assim, intui-se que, provavelmente, o *miRNA* identificado também esteja regulando as vias de ação do TGF-beta.

A participação do TGF-beta na indução da apoptose é muito bem estabelecida, mesmo em células do epitélio da lente humana. Em experimento *in vitro*, foi possível

observar que células epiteliais obtidas a partir da lente humana receberam tratamento com TGF-beta e foram induzidas ao processo de apoptose, apresentando redução da expressão de Bcl-2, uma proteína antiapoptótica (LEE et al., 2002). Infere-se, portanto, que o mesmo possa ocorrer em cataratas imaturas de cães, pois houve baixa expressão do cfa-miR-450b, cujo *miRNA* homólogo humano está correlacionado à genes envolvidos na expressão do TGF-beta. Partindo destas assertivas é possível prever que alterações na expressão de *miRNAs* relacionados às vias supracitadas podem desencadear uma série de fatores causadores de danos teciduais, como estresse oxidativo, considerado um dos principais fatores de danos às células do epitélio da lente em cataratas, conforme demonstrado por Otonello et. al. (2000) em estudo anterior na espécie canina.

Além do papel crucial no processo de apoptose associado ao TGF-beta em células epiteliais da lente com catarata, inúmeras evidências têm surgido indicando que haja uma segunda função atribuída às proteínas da família do TGF-beta: a habilidade de indução de transição epitélio-mesenquimal. (LEE et. Al, 2002). Estudos realizados com explantes ou lentes inteiras demonstraram que o TGF-beta induz a alterações morfológicas, como formação de células fusiformes, irregularidade na superfície capsular e deposição de matriz extracelular, bem como a expressão de colágeno tipo I e III, laminina, alfa-actina de músculo liso, fibronectina e tenascina, elementos característicos da formação de catarata subcapsular (LEE et. al., 2002), que é exatamente o observado em cataratas em cães, principalmente nas maduras (COLITZ et al., 2000). Como foi revelada a expressão do cfa-miR-450b em cataratas imaturas, pode-se prever que em estágios mais iniciais do processo cataratogênico, haja interação deste *miRNA* com a expressão de TGF-beta, que leva a ocorrência das alterações descritas devendo, portanto, ser considerada na patogênese da catarata em cães (LEE et. al., 2002). Adjutoramente, o TGF possui ampla atuação promotória ou inibitória em diversos tecidos, no entanto, *in vitro* apresenta redução da proliferação de células do epitélio da lente de bovinos (DE IONGH et al, 2005), conforme nós presumimos ocorrer em cães, frente aos dados do microarranjo. Em situação patológica, a desregulação dos níveis de TGF no humor aquoso está intimamente associada a diferenciação das células do epitélio em células fibroblásticas ou miofibroblásticas, envolvidas no processo de transição epitélio-mesenquimal presente na catarata. (DE IONGH et. al., 2005).

Cães portadores de catarata diabética possuem elevado nível sérico de TGF-beta 1, que está intimamente associado a diversos processos de fibroplasia em outros órgãos, o que deve ser considerado como alvo futuro de investigação. A literatura demonstra a associação do TGF-beta-1 em humanos com catarata diabética, bem como em cães (NEUMANN et. al. ,2017). O estudo não identificou a expressão da proteína em todos os casos devido ao fato de que a deposição de matriz colágena seja o último estágio da doença culminando a uma menor expressão de fatores, permitindo concluir que o mesmo ocorra em cães não diabéticos e portadores de catarata madura, já que não houve a expressão diferencial de *miRNAs*, principalmente o cfa-MiR-1307 e cfa-miR-450.

Ainda correlacionados ao homólogo humano (hsa-miR-450b-5p) e sua interação com a expressão TGF-beta, destaca-se o *Smad3*, proteína intracelular sinalizadora para o TGF-beta. *Smad3* media a proliferação de tecido fibroso, cujo índice de apoptose aumenta na sua ausência, sugerindo assim, o papel central do TGF-beta como mediador da via de sinalização do *Smad* (de IONGH et. al., 2005).

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo e nas condições aqui adotadas, concluiu-se pela identificação inédita de dois *miRNA* diferencialmente expressos nas cataratas imaturas em cães em comparação à lentes transparentes; os *miRNAs* diferencialmente expressos foram o cfa-miR-1307 e cfa-miR-450b, infraregulados, que, provavelmente, participam do processo de apoptose das células epiteliais da lente e inibição da proliferação celular. Presume-se, ainda, que o cfa-miR-450b, também atue nas vias do TGF-beta, correlacionado a indução das células epiteliais da lente a sofrerem alterações morfológicas, com transformação das mesmas em células fusiformes, justificando, por vezes, a ocorrência de irregularidade na superfície capsular e deposição de matriz extracelular.

Essa expressão alterada oferece vias para novas pesquisas sobre a função dos *miRNAs* com estudos de microtranscriptoma, criando assim, inúmeras possibilidades de novos estudos a despeito de possíveis vias biológicas envolvidas na catarata no cão, bem como a identificação de pontos-chaves para novas condutas terapêuticas frente aos avanços promissores no campo da terapia gênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, J. B.; DAVIDSON, M. G.; NASISSE, M. P.; FLEISHER, L. N.; MCGAHAN, M. C. The lens influences aqueous humor levels of transforming growth factor-beta 2. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, Heidelberg, v. 236, n. 4, p. 305-311, Apr. 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s004170050083>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs004170050083>. Acesso em: 20 out. 2020.

BARNETT, K. C. The diagnosis and differential diagnosis of cataract in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 305-316, June 1985. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1985.tb02204.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1985.tb02204.x>. Acesso em: 20 out. 2020.

BARNETT, K. C.; STARTUP, F. G. Hereditary cataract in the standard poodle. **Veterinary Record**, Oxford, v. 117, n. 1, p.15-16, July 1985. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.117.1.15>.

BARNETT, K. C.; STARTUP, F. G. Hereditary cataract in the German Shepherd dog. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 387-95, June 1986. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1986.tb02153.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1986.tb02153.x>. Acesso em: 20 out. 2020.

BARNETT, K. C.; STARTUP, F. G. Inherited eye disease in the dog and cat. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 29, n. 7, p. 462-475, July 1988. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1988.tb03514.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1988.tb03514.x>. Acesso em: 20 out. 2020.

BAYLIN, S. B.; ESTELLER, M.; ROUNTREE, M. R.; BACHMAN, K. E.; SCHUEBEL, K.; HERMAN, J. G. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 10, n. 7, p. 687-

692, Apr. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/10.7.687>. Disponível em: <https://academic.oup.com/hmg/article/10/7/687/558535>. Acesso em: 20 out. 2020.

BERNSTEIN, B. E.; MEISSNER, A.; LANDER, E. S. The mammalian epigenome. **Cell**, Cambridge, v. 128, n. 4, p. 669-681, Feb. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.033>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867407001286>. Acesso em: 20 out. 2020.

BISTNER, S. I. Recent developments in comparative ophthalmology. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, Yardley, v. 14, n. 10, p. 1304-23, 1992.

BJERKÅS, E.; BERGSJØ, T. Hereditary cataract in the Rottweiler dog. **Progress in Veterinary & Comparative Ophthalmology**, Washington, v. 1, n. 1, p. 7-10, 1991.

BOEVE, M. H.; VAN DER LINDE-SPIMAN, J. S.; STADES, F. C. Early morphogenesis of the canine lens capsule, tunica vasculosa lentis posterior, and anterior vitreous body: a transmission electron microscopic study. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, Heidelberg, v. 227, n. 6, p. 589-594, Nov. 1989. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02169458>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02169458>. Acesso em: 20 out. 2020.

WU, C.; LIN, H.; WANG, Q.; CHEN, W.; LUO, H.; CHEN, W.; ZHANG, H. Discrepant expression of MicroRNAs in transparent and cataratous human lens. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville, v. 53, n. 7, p. 3906-3912, June 2012. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.11-9178>. Disponível em: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2128615>. Acesso em: 20 out. 2020.

CHEN, S.; WANG, L.; YAO, B.; LIU, Q.; GUO, C. miR-1307-3p promotes tumor growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by repressing DAB2 interacting protein. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie**, Paris, v.117, article 109055, Sept. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109055>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332219322334>. Acesso em: 20 out. 2020.

COLITZ, C. M.; MALARKEY, D.; DYKSTRA, M. J.; MCGAHAN, M. C.; DAVIDSON, M. G. Histologic and immunohistochemical characterization of lens capsular plaques in dogs with cataracts. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 61, n. 2, p. 139-143, Feb. 2000. DOI: <https://doi.org/10.2460/ajvr.2000.61.139>. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/doi/pdfplus/10.2460/ajvr.2000.61.139>. Acesso em: 20 out. 2020.

COLLINS, B. K.; COLLIER, L. L.; JOHNSON, G. S.; SHIBUYA, H.; MOORE, C. P.; CURIEL, J. M. S. Familial cataracts and concurrent ocular anomalies in Chow Chows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 200, n. 10, p. 1485-1491, May 1992.

CURTIS, R.; BARNETT, K. C. A survey of cataracts in Golden and Labrador Retrievers. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 277-286, May 1989. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1989.tb01557.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1989.tb01557.x>. Acesso em: 20 out. 2020.

DAI, F.; MEI, L.; MENG, S.; MA, Z.; GUO, W.; ZHOU, J.; ZHANG, J. The global expression profiling in esophageal squamous cell carcinoma. **Genomics**, San Diego, v. 109, n. 3-4, p. 241-250, July 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.04.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754317300289>. Acesso em: 20 out. 2020.

DAVIDSON, M. G.; NASISSE, M. P.; JAMIESON, V. E.; ENGLISH, R. V.; OLIVERO, D. K. Phacoemulsification and intraocular lens implantation: a study of surgical results in 182 dogs. **Progress in Veterinary & Comparative Ophthalmology**, Washington, v. 1, n. 4, p. 233-238, 1991.

DE IONGH, R. U.; WEDERELL, E.; LOVICU, F. J.; MCAVOY, J. W. Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation. **Cells, Tissues, Organs**, Basel, v. 179, n. 1-2, p. 43-55, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1159/000084508>. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/84508>. Acesso em: 20 out. 2020.

DZIEZYC, J. Cataract surgery: current approaches. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 3, p. 737-54, May 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(90\)50060-1](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(90)50060-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195561690500601>. Acesso em: 20 out. 2020.

FISCHER, C. Geriatric ophthalmology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 19, n. 1, p. 103-23, Jan. 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(89\)50008-1](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(89)50008-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195561689500081>. Acesso em: 20 out. 2020.

FOSTER, A.; RESNIKOFF, S. The impact of Vision 2020 on global blindness. **Eye**, London, v. 19, n. 10, p. 1133-1135, Oct. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6701973>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/6701973>. Acesso em: 20 out. 2020.

GEBERT, L. F. R.; MACRAE, I. J. Regulation of microRNA function in animals. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, London, v. 20, n. 1, p. 21-37, Jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41580-018-0045-7>. Acesso em: 20 out. 2020.

GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 2007. 1671 p.

GLOVER, T. D.; CONSTANTINESCU, G. M. Surgery for cataract. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 27, n. 5, p. 1143-1173, Sept. 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(97\)50107-0](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(97)50107-0). Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195561697501070>. Acesso em: 20 out. 2020.

HALES, A. M.; CHAMBERLAIN, C. G.; MCAVOY, J. W. Cataract induction in lenses cultured with transforming growth factor-beta. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville, v. 36, n. 8, p. 1709-1713, July 1995. Disponível em: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2161808>. Acesso em: 20 out. 2020.

HE, Q.; FANG, Y.; LU, F.; PAN, J.; WANG, L.; GONG, W.; FEI, F.; CUI, J.; ZHONG, J.; HU, R.; LIANG, M.; FANG, L.; WANG, H.; YU, M.; ZHANG, Z. Analysis of differential expression profile of miRNA in peripheral blood of patients with lung cancer. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 33, n. 9, article e23003, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.23003>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.23003>. Acesso em: 20 out. 2020.

JAENISCH R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of the genic expression: how the genoma integrates intrinsic and environment. **Nature Genetics**, New York, v. 33, p. 245-254, Mar. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng1089>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ng1089z>. Acesso em: 20 out. 2020.

JIANG, J.; ZHOU, J.; YAO, Y.; ZHU, R.; LIANG, C.; JIANG, S.; YANG, M.; LU, Y.; XING, Q.; GUAN, H. Copy number variations of DNA repair genes and the age-related cataract: Jiangsu Eye Study. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville, v. 54, n. 2, p. 932-938, Feb. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10948>. Disponível em: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2128877>. Acesso em: 20 out. 2020.

JOHNSON, B. C.; MILLER, W. W. Recognizing ocular signs of systemic diseases in dogs. **Veterinary Medicine**, [s.l.], v. 85, n. 10, p. 1076-90, 1990.

KARALI, M.; PELUSO, I.; MARIGO, V.; BANFI, S. Identification and characterization of microRNAs expressed in the mouse eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville, v. 48, n. 2, p. 509-515, Feb. 2007. DOI:

<https://doi.org/10.1167/iovs.06-0866>. Disponível em:
<https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2125788>. Acesso em: 20 out. 2020.

KUROSAKA, D.; KATO, K.; NAGAMOTO, T.; NEGISHI, K. Growth factors influence contractility and alpha-smooth muscle actin expression in bovine lens epithelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville, v. 36, n. 8, p.1701-1708, July 1995. Disponível em: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2161781>. Acesso em: 20 out. 2020.

LA CROIX, N. L. Cataracts: when to refer. **Topics in Companion Animal Medicine**, New York, v. 23, n. 1, p. 46-50, Feb. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.ctsap.2007.12.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096286707001077>. Acesso em: 20 out. 2020.

LEE, J. H.; WAN, X. H.; SONG, J.; KANG, J. J.; CHUNG, W. S.; LEE, E. H.; KIM, E. K. TGF-beta-induced apoptosis and reduction of Bcl-2 in human lens epithelial cells in vitro. **Current Eye Research**, London, v. 25, n. 3, p. 147-53, Sept. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1076/ceyr.25.3.147.13475>. Disponível em: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=9218724&lang=pt-br&site=ehost-live>. Acesso em: 20 out. 2020.

LIM, S. O.; GU, J. M.; KIM, M. S.; KIM, H. S.; PARK, Y. N.; PARK, C. K.; CHO, J. W.; PARK, Y. M.; JUNG, G. Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma: methylation of the E-cadherin promoter. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 135, n.6, p. 2128-2140, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.027>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508508013711>. Acesso em: 20 out. 2020.

LUO, Y. F.; WANG, B. B.; ZHOU, Z.; DING, X. C.; HU, S. S.; ZHOU, G. K.; MA, X.; QI, Y. H. Polymorphisms of the DNA repair genes XPD and XRCC1 and the risk of age-related cataract development in Han Chinese. **Current Eye Research**, London, v. 36, n. 7, p. 632-636, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3109/02713683.2011.571358>.

Disponível em:
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=61138814&lang=pt-br&site=ehost-live>. Acesso em: 20 out. 2020.

NAKAO, M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. **Gene**, Amsterdam, v. 278, p. 25-31, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00721-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00721-1). Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111901007211?via%3Dihub>. Acesso em: 20 out. 2020.

NASISSE, M. P.; DAVIDSON, M. G.; JAMIESON, V. E.; ENGLISH, R. V.; OLIVERO, D. K. Phacoemulsification and intraocular lens implantation: a study of technique in 182 dogs. **Progress in Veterinary & Comparative Ophthalmology**, Washington, v.1, n.4, p.225-232, 1991.

NEUMANN, S.; LINEK, J.; LOESENBECK, G.; SCHÜTTLER, J.; GAEDKE, S. TGF- β 1 serum concentrations and receptor expressions in the lens capsular of dogs with diabetes mellitus. **Open Veterinary Journal**, Tripoli, v. 7, n. 1, p. 12-15, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ovj.v7i1.2>. Disponível em:
<https://www.openveterinaryjournal.com/2017/Volume%207%20No%201/OVJ-121-05-16%20S.%20Neumann%20et%20al.pdf>. Acesso em: 20 out. 2020.

MARUNO, K.A., LOVICU, F.J., CHAMBERLAIN, C.G., MCAVOY, J.W. Apoptosis is a feature of TGF beta-induced cataract. **Clinical and Experimental Optometry**, Oxfordshire, v. 85, n. 2, p. 76-82, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2002.tb03012.x>. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1444-0938.2002.tb03012.x?sid=vendor%3Adatabase>. Acesso em: 20 out. 2020.

MENG, F.; LI, J.; YANG, X.; YUAN, X.; TANG, X. Role of Smad3 signaling in the epithelial-mesenchymal transition of the lens epithelium following injury. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 42, n. 2, p. 851-860, Aug. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3662>. Disponível em:

<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=29750298&lang=pt-br&site=ehost-live>. Acesso em: 20 out. 2020.

MÜLLER, C.; WÖHLKE, A.; DISTL, O. Evaluation of three canine γ -crystallins (*CRYGB*, *CRYGC*, and *CRYGS*) as candidates for hereditary cataracts in the dachshund. **Molecular Vision**, Atlanta, v. 13, p. 125-132, 2007. Disponível em: <http://www.molvis.org/molvis/v13/a15/>. Acesso em: 20 out. 2020.

OTTONELLO, S.; FORONI, C.; CARTA, A.; PETRUCCO, S.; MARAINI, G. Oxidative stress and age-related cataract. **Ophthalmologica**, Basel, v. 214, n. 1., p. 78-85, Jan.-Feb. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1159/000027474>. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/27474>. Acesso em: 20 out. 2020.

PACZKOWSKA, J.; JANISZEWSKA, J.; USTASZEWSKI, A.; BEIN, J.; SKALSKI, M.; DZIKIEWICZ-KRAWCZYK, A.; ROZWADOWSKA, N.; HANSMANN, M. L.; HARTMANN, S.; GIEFING, M. Deregulated miRNAs contribute to silencing of B-Cell specific transcription factors and activation of NF- κ B in classical Hodgkin Lymphoma. **Cancers**, Basel, vol.23, n.13,p.3131, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13133131>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/13/3131>. Acesso em: 20 out. 2020.

PADMA, G.; MAMATA, M.; REDDY, K. R.; PADMA, T. Polymorphisms in two DNA repair genes (XPD e XRCC1) – association with age related cataracts. **Molecular Vision**, Atlanta, v. 17, p. 127-133, 2011. Disponível em: <http://www.molvis.org/molvis/v17/a16/>. Acesso em: 20 out. 2020.

RESNIKOFF, S.; PASCOLINI, D.; ETYA'ALE, D.; KOCUR, I.; PARARAJASEGARAM, R.; POKHAREAL, G. P.; MARIOTTI, S. P. Global data on visual impairment the year 2020. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 82, n.11, p. 844-851, 2004. Disponível em: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=14891920&lang=pt-br&site=ehost-live>. Acesso em: 20 out. 2020.

RYAN, D. G.; OLIVEIRA-FERNANDES, M.; LAVKER, R. M. MicroRNAs of mammalian eye display distinct and overlapping tissue specificity. **Molecular Vision**, Atlanta, v. 12, p. 1175-84, 2006. Disponível em: <http://www.molvis.org/molvis/v12/a134/>. Acesso em: 20 out. 2020.

SAIKA S. TGF-beta signal transduction in corneal wound healing as a therapeutic target. **Cornea**, Philadelphia, v. 23, n. 8, p. S25-S30, Nov. 2004. Disponível em: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=ovftg&NEWS=N&AN=00003226-200411001-00005>. Acesso em: 20 out. 2020.

SAIKA, S.; YAMANAKA, O.; OKADA, Y.; TANAKA, S. I.; MIYAMOTO, T.; SUMIOKA, T.; KITANO, A.; SHIRAI, K.; IKEDA, K. TGF beta in fibroproliferative diseases in the eye. **Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)**, Albertson, v. 1, n. 1, p. 376-390, 2009. DOI: <https://doi.org/10.2741/S32>. Disponível em: <https://www.fbscience.com/Scholar/articles/10.2741/S32>. Acesso em: 20 out. 2020.

SHASTRY, B.S., REDDY, V.N. Studies on congenital hereditary cataract and microphthalmia of the miniature Schnauzer dog. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 203, n. 3, p. 1663-1667, 30 Sept. 1994. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2377>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X84723771>. Acesso em: 20 out. 2020.

SUN, J. K.; IWATA, T.; ZIGLER, J. S. JR.; CARPER, D. A. Differential gene expression in male and female rat lenses undergoing cataract induction by transforming growth factor-beta (TGF-beta). **Experimental Eye Research**, London, v. 70, n. 2, p. 169-181, Feb. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1006/exer.1999.0771>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483599907716>. Acesso em: 20 out. 2020.

SUN, Y.; XIONG, L.; WANG, X.; WANG, L.; CHEN, B.; HUANG, J.; HUANG, M.; CHEN, J.; WU, J.; HUANG, S.; LIU, Y. Autophagy inhibition attenuates TGF- β 2-induced epithelial-mesenchymal transition in lens epithelial cells. **Life Sciences**, London, v. 265, article 118741, 15 Jan. 2021. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118741>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320520314946>. Acesso em:
 20 out. 2020.

TREUTING, P.; DINTZIS, S.; MONTINE, K. S. **Comparative anatomy and histology:** a mouse, rat, and human atlas. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 2017. 570 p.

URFER, S. R.; GREER, K.; WOLF, S. N. Age-related cataract in dogs: a biomarker for life span and its relation to body size. **Age**, Dordrecht, v. 33, n. 3, p. 451-460, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11357-010-9158-4>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3168595/>. Acesso em: 20 out. 2020.

WACHSMAN, J. T. DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. **Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 375, p. 1-8, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00003-1](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00003-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510797000031?via%3Dihub>. Acesso em: 20 out. 2020.

WHITLEY, R. D.; McLAUGHLIN, S. A.; WHITLEY, E. M.; GILGER, B. C. Cataract removal in dogs: the presurgical considerations. **Veterinary Medicine**, [s.l.], v. 88, n. 9, p. 848-858, 1993.

WILLIAMS, D. L.; BOYDELL, I. P.; LONG, R. D. Current concepts in the management of canine cataract: a survey of techniques used by surgeons in Britain, Europe and the USA and a review of recent literature. **Veterinary Record**, Oxford, v.138, n.15, p.347-53, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.138.15.347>. Disponível em: <https://bvajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1136/vr.138.15.347>. Acesso em: 20 out. 2020.

WILLIAMS, D. L.; MUNDAY, P. The effect of a topical antioxidant formulation including N-acetyl-carnosine on canine cataract: preliminary study. **Veterinary Ophthalmology**, Hoboken, v. 9, n. 5, p. 311-316, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1463->

5224.2006.00492.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1463-5224.2006.00492.x>. Acesso em: 20 out. 2020.

WORGUL, B. V.; MERRIAM, Jr. G.R.; MEDVEDOVSKY, C. Cortical cataract development: an expression of primary damage to the lens epithelium. **Lens Eye and Toxicology Research**, New York, v. 6, n. 4, p. 559-571, 1989.

YANG, Z.; LI, R.; AO, J.; WA, Q. D.; ZHANG, Y.; CHEN, L.; WEN, J.; CHEN, B.; PAN, W.; LI, B.; TIAN, X. B. miR-1307-3p suppresses the chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by targeting BMP2. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 42, n. 6, p. 3115-3124, Dec. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3891>. Disponível em: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=30272255&lang=p t-br&site=ehost-live>. Acesso em: 20 out. 2020.

ZACHARY, J. F. **Pathologic basis of veterinary disease**. 6. ed. St. Louis: Elsevier Mosby, 2017. 1318 p.

ZHANG, Y.; ZHANG, L.; SONG, Z.; SUN, D. L.; LIU, H. R.; FU, S. B.; LIU, D. R.; LIU, P. Genetic polymorphisms in DNA repair genes OGG1, APE1, XRCC1, and XPD and the risk of age-related cataract. **Ophthalmology**, Rochester, v. 119, n. 5., p. 900-906, May 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2011.11.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161642011010505>. Acesso em: 20 out. 2020.

ZHANG, Z.; YANG, X.; LIU, O.; CAO, X.; TONG, J.; XIE, T.; ZHANG, J.; PENG, Y. Differentially expressed microRNAs in peripheral blood mononuclear cells of non-segmental vitiligo and their clinical significance. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 35, n. 2, article e23648, Feb. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.23648>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.23648>. Acesso em: 20 out. 2020.

ZHAO, L.; CHEN, X. J.; ZHU, J.; XI, Y.B.; YANG, X.; HU, L. D.; OUYANG, H.; PATEL, S. H.; JIN, X.; LIN, D.; WU, F.; FLAGG, K.; CAI, H.; LI, G.; CAO, G.; LIN, Y.; CHEN,

D.; WEN, C.; CHUNG, C.; WANG, Y.; QIU, A.; YEH, E.; WANG, W.; HU, X.; GROB, S.; ABAGYAN, R.; SU, Z.; TJONDRO, H. C.; ZHAO, X. J.; LUO, H.; HOU, R.; JEFFERSON, J.; PERRY, P.; GAO, W.; KOZAK, I.; GRANET, D.; LI, Y.; SUN, X.; WANG, J.; ZHANG, L.; LIU, Y.; YAN, Y. B.; ZHANG, K. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. **Nature**, London, v. 523, n. 7562, p. 607-611, 30 July 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature14650>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature14650>. Acesso em: 20 out. 2020.

ZHENG, Y.; ZHENG, Y.; LEI, W.; XIANG, L.; CHEN, M. miR-1307-3p overexpression inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis by targeting ISM1 in colon cancer. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 48, article 101445, Dec. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.101445>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890850819302464>. Acesso em: 20 out. 2020.

ZHOU, P.; LUO, Y.; LIU, X.; FAN, L.; LU, Y. Down-regulation and CpG island hypermethylation of CRYAA in age-related nuclear cataract. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 26, n. 12, p. 4897-4902, Dec. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.12-213702>. Disponível em: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.12-213702>. Acesso em: 20 out. 2020.

ZHU, H. J.; BURGESS, A. W. Regulation of transforming growth factor-beta signaling. **Molecular Cell Biology Research Communications**, San Diego, v. 4, n. 6, p. 321-330, Nov. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/mcbr.2001.0301>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1522472401903010>. Acesso em: 20 out. 2020.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

ATESTADO Nº. 133/2021 - CEUA

ATESTO, para os devidos fins, que a **Professora Assistente Doutora Suely Regina Mogami Bomfim** foi **parecerista** Projeto de Pesquisa intitulado **"Análise da expressão de miRNAs em lentes de cães portadores de catarata imatura e madura"**, Processo FOA-0552/2021, do(a) Pesquisador(a) Alexandre Lima de Andrade.

Araçatuba, 13 de agosto de 2021.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "João Carlos Callera".

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

