

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DO INIBIDOR DA RHO QUINASE (ROCK, Y-
27632) SOBRE O ENDOTÉLIO CORNEAL EM CÃES
SUBMETIDOS À FACOEMULSIFICAÇÃO**

**Marcella Rosa Filezio
Médica Veterinária**

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DO INIBIDOR DA RHO QUINASE (ROCK, Y-
27632) SOBRE O ENDOTÉLIO CORNEAL EM CÃES
SUBMETIDOS À FACOEMULSIFICAÇÃO**

Discente: Marcella Rosa Filezio

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paola Castro Moraes

Coorientadores: Prof. Dr. José Luiz Laus

Dr. Ivan Ricardo Martinez Pádua

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como
parte das exigências para a obtenção
do título de Mestre em Cirurgia
Veterinária.**

2020

F481e Filezio, Marcella Rosa
Efeitos do Inibidor da rho quinase (ROCK, Y-27632) sobre o endotélio corneal em cães submetidos a facoemulsificação / Marcella Rosa Filezio. -- Jaboticabal, 2020
67 f. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Paola Castro Moraes
Coorientador: José Luiz Laus

1. Oftalmologia Veterinária. 2. Cirurgia Veterinária. 3. Facoemulsificação. 4. Catarata. 5. Cães. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITOS DO INIBIDOR DA RHO QUINASE (ROCK, Y-27632) SOBRE O ENDOTÉLIO CORNEAL EM CÃES SUBMETIDOS À FACOEMULSIFICAÇÃO

AUTORA: MARCELLA ROSA FILEZIO

ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES

COORIENTADOR: IVAN RICARDO MARTINEZ PADUA

COORIENTADOR: JOSÉ LUIZ LAUS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOSÉ LUIZ LAUS
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. FABRÍCIO SINGARETTI DE OLIVEIRA
Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV - UNESP

Dra. KARINA KAMACHI KOBASHIGAWA
Médica Veterinária Autônoma / Bebedouro/SP

Jaboticabal, 28 de fevereiro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Marcella Rosa Filezio, nascida no município de São Paulo - SP, aos vinte e cinco dias do mês de novembro de 1991. Graduou-se em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP em 2012. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal, em 2013. Durante a graduação, realizou estágios em Imunologia, Parasitologia, Odontologia de Pequenos Animais, Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, Nefrologia e Urologia, Oftalmologia Veterinária e Medicina Felina. Foi monitora voluntária junto à disciplina de Técnica Cirúrgica Veterinária. Realizou estágio curricular junto ao Centro Oftalmológico Veterinário Goya, sob supervisão do M.V. Dr. Manuel Villagrasa. Foi aluna de Iniciação Científica por três anos, dois deles como bolsista PIBIC/CNPq, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Laus. Obteve o título de Médica Veterinária em 2017. Atualmente é aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Jaboticabal, ao qual ingressou em 2018, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Paola Castro Moraes. Colabora ao atendimento clínico e cirúrgico junto ao Setor de Oftalmologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” – UNESP/Jaboticabal.

EPÍGRAFE

“The soul, fortunately, has an interpreter - often an unconscious but still faithful interpreter - in the eye.”

— Charlotte Brontë, *Jane Eyre*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Marcia e Marco, e minha irmã, Marina, por todo apoio durante o período de graduação e pós-graduação, por compreender as longas ausências e por compartilhar comigo a alegria de cada etapa superada.

Às minhas avós Lucinda e Terezinha (*in memoriam*) por todo o amor e carinho que me dedicam.

Aos meus amigos e companheiros do Serviço de Oftalmologia Veterinária, tanto os presentes quanto os que por lá passaram, agradeço pela colaboração na execução deste trabalho e por todo conhecimento generosamente compartilhado. À Karina Herencia, Daniela, Gabriela, Francimery e Alexandre. Os agradeço por me ensinarem a cada dia e por serem parte da minha família em Jaboticabal. Esta pesquisa é fruto de um trabalho em equipe, e tudo foi possível graças à colaboração de cada membro desse maravilhoso grupo.

À Fabiana del Lama Rocha pela disponibilidade e colaboração nas anestésias das facoemulsificações.

À minha orientadora Professora Paola Castro Moraes, agradeço imensamente por todos os ensinamentos, pela orientação neste projeto e, principalmente, por todo apoio e todo carinho com que me acolheu como sua orientada.

Ao Professor José Luiz Laus, por abrir-me as portas do Serviço de Oftalmologia, por toda sabedoria compartilhada, pelas maravilhosas oportunidades proporcionadas e por ser meu grande exemplo a seguir dentro da Oftalmologia Veterinária.

Ao meu coorientador Ivan, agradeço primeiramente por ter confiado a mim um projeto tão bonito e bem estruturado. Agradeço por todos os ensinamentos e orientações durante o desenvolvimento deste projeto de pesquisa. Agradeço também por todo conhecimento clínico e cirúrgico compartilhado durante nossos dias de atendimento e por cada oportunidade proporcionada.

Aos professores Annelise Camplesi, Karina Kobashigawa e Fabrício Singaretti, por comporem a banca do exame geral de qualificação e defesa desta dissertação e pelas valiosas sugestões e correções que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Aos professores Alan Panosso e Gener Tadeu Pereira pela ajuda com as análises estatísticas deste trabalho.

Aos professores, residentes, pós-graduandos, funcionários e estagiários do Hospital Veterinário, agradeço pelo trabalho em equipe e por terem sido parte fundamental no meu aprendizado nesta instituição.

A todos os tutores e pacientes que passaram pelo meu atendimento no Serviço de Oftalmologia Veterinária, e em especial àqueles que integraram este projeto de pesquisa, agradeço pela confiança e pela colaboração.

À minha querida amiga Danyelle Cintra, agradeço pela convivência maravilhosa, pelo companheirismo durante cada etapa do mestrado e por sempre me oferecer incontáveis palavras de incentivo e conforto.

Às minhas amigas Laura Zanato e Camila Borsaro pelo companheirismo e amizade.

Aos meus filhotes Georgia, Paco e Ovelha, por serem a alegria dos meus dias e a razão pela qual desejo ser uma melhor pessoa e melhor profissional a cada dia.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, e à FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (processo nº 2018/02925-5) pelo apoio financeiro essencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro no início deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Gratidão a todos.

DEDICATÓRIA

Aos meus fiéis companheiros Georgia,
Ovelha e Paco.

SUMÁRIO

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Figuras.....	viii
1.Introdução	1
2. Revisão de Literatura.....	1
3. Justificativa e Objetivos.....	8
3.1 Justificativa.....	8
3.2 Objetivos Gerais.....	9
3.3 Objetivos Específicos.....	9
4. Material e Métodos.....	9
4.1 Pacientes – Critérios de Inclusão.....	9
4.2 Grupos.....	11
4.3 Procedimentos.....	11
4.3.1 Procedimentos pré-operatórios.....	11
4.3.2 Procedimentos anestésicos.....	12
4.3.3 Facoemulsificação.....	12
4.3.4 Procedimentos pós-operatórios.....	13
4.4 Protocolos de avaliação.....	14
4.4.1 Facoemulsificação.....	14
4.4.2 Avaliação clínica.....	14
4.4.3 Microscopia Especular.....	15
4.4.4 Quantificação do <i>flare</i> – “ <i>Laser cell-flare meter</i> ”.....	16
4.5 Estatística.....	16
5. Resultados.....	17
5.1 Pacientes.....	17
5.2 Protocolos de avaliação.....	18
5.2.1 Facoemulsificação.....	18
5.2.2 Avaliação clínica.....	20
5.2.3 Quantificação do <i>flare</i> – “ <i>Laser cell-flare meter</i> ”.....	24

5.2.4 Microscopia Especular.....	25
6. Discussão.....	29
7. Conclusões.....	37
8. Referências.....	38



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Efeitos do inibidor da RHO QUINASE (ROCK, Y-27632) sobre o endotélio corneal cães submetidos à faoemulsificação", protocolo nº 011132/18, sob a responsabilidade da Profª Drª Paola Castro Moraes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de setembro de 2018.

Vigência do Projeto	17/09/2018 a 31/10/2019
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	10
Peso / Idade	2-30 kg
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Pacientes com catarata atendidos na rotina do Serviço de Oftalmologia do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP campus de Jaboticabal

Jaboticabal, 06 de setembro de 2018.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

EFEITOS DO INIBIDOR DA RHO QUINASE (ROCK, Y-27632) SOBRE O ENDOTÉLIO CORNEAL EM CÃES SUBMETIDOS A FACOEMULSIFICAÇÃO

RESUMO - A catarata situa-se entre as afecções oculares mais frequentes em cães. A facoemulsificação é o método que melhor se adéqua à sua terapia e o preferido entre os oftalmologistas. Dentre as complicações pós-operatórias destacam-se lesões endoteliais que podem produzir descompensação permanente da córnea, alterando a sua transparência. Buscou-se avaliar os efeitos do inibidor de ROCK (Y-27632), na proteção endotelial, em cães submetidos à facoemulsificação. Utilizaram-se 20 olhos de 10 pacientes, machos ou fêmeas, com sete a 12 anos, portando catarata senil bilateral. Dois grupos foram concebidos: Olhos controles (Oc) (n=10), receberam solução salina balanceada e Olhos Tratados (Ot) (n=10), receberam intracameralmente, 0,3 mL de Y-27632, na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$, imediatamente após a sutura corneal. O endotélio corneal foi avaliado à microscopia especular de não contato, antes e em diferentes momentos após a facoemulsificação. Avaliaram-se a densidade (células/ mm^2) e a área celular (μm^2), a espessura corneal (mm), a hexagonalidade (%) e o coeficiente de variação do tamanho celular (%). Valores de P iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos. Com relação à densidade de células endoteliais, ambos os grupos apresentaram perdas, sem diferença estatística. Relativamente à espessura corneal e hexagonalidade, não houve diferença. No Oc, a área celular aumentou significativamente entre os momentos avaliados, o que não foi observado em Ot. Admite-se que a aplicação intracameral de 0,3mL contendo 100 $\mu\text{mol/L}$ de Y-27632 durante o procedimento de facoemulsificação em cães em condições normais, colabora com a estabilidade das células do endotélio corneal, diminuindo sua perda (7,4%) em comparação com sua não utilização (11,8%).

Palavras-chave: cão, catarata, córnea, rho quinase (ROCK).

EFFECTS OF RHO KINASE INHIBITOR (ROCK, Y-27632) ON THE CORNEAL ENDOTHELIUM OF DOGS UNDERGOING PHACOEMULSIFICATION

ABSTRACT - Cataract is among the most common eye diseases in dogs. Phacoemulsification is the method that best fits its therapy. Among the complications related to this surgery, there are endothelial injuries that can induce permanent corneal decompensation, altering its transparency. The goal of this study was to evaluate the effects of ROCK inhibitor Y-27632 on endothelial protection in dogs undergoing phacoemulsification. Twenty eyes of 10 patients, male or female, aged 7 to 12 years, with bilateral senile cataract were used. Two groups were conceived: Control eyes (Oc) (n = 10), that received balanced saline solution (BSS) and Treated Eyes (Ot) (n = 10), which received intracamerally 0.3 mL of Y-27632 at a concentration of 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$, immediately after corneal suture. The corneal endothelium was assessed via non-contact specular microscopy at multiple time points before and after phacoemulsification. Cell density (cells/ mm^2) and area (μm^2), corneal thickness (mm), hexagonality (%), and the coefficient of variation of cell size (%) were all assessed. P values equal to or less than 0.05 were considered significant. With respect to the density of endothelial cells, both groups showed losses, without statistical difference. There were no differences in corneal thickness and hexagonality. In Oc, the cellular area increased significantly between the evaluated moments, what was not observed in Ot. It is admitted that the intracameral application of 0.3mL containing 100 $\mu\text{mol/L}$ of Y-27632 during the phacoemulsification procedure in dogs under normal conditions, collaborates with the stability of the corneal endothelium cells, decreasing their loss (7.4%), compared to their non-use (11.8%).

Keywords: canine, cataract, cornea, rho kinase (ROCK).

LISTA DE TABELAS

<p>Tabela 1. Identificação de pacientes da espécie canina submetidos à facoemulsificação, segundo raça, sexo e idade. Serviço de Oftalmologia – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” – FCAV – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, 2020.....</p>	18
<p>Tabela 2. Intensidade/escore de referenciais da avaliação clínica no Oc e no Ot em pacientes da espécie canina anteriormente ao procedimento cirúrgico de facoemulsificação (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.....</p>	23
<p>Tabela 3. Valores de <i>flare</i> (ph/ms) de Oc e Ot, em pacientes da espécie canina, anteriormente ao procedimento cirúrgico de facoemulsificação (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.....</p>	24
<p>Tabela 4. Valores da Pressão Intraocular (PIO; mmHg) de Oc e Ot, em pacientes da espécie canina, anteriormente ao procedimento cirúrgico de facoemulsificação (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.....</p>	25
<p>Tabela 5. Valores da densidade celular endotelial (células/mm²), Diferença entre as médias (DM; células/mm²) e Mudança na contagem (MC; %) no Oc e Ot, em pacientes da espécie canina, anteriormente ao procedimento cirúrgico de facoemulsificação (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.....</p>	26
<p>Tabela 6. Valores da área das células endoteliais (µm²) no Oc e no Ot em pacientes da espécie canina, anteriormente ao procedimento cirúrgico de facoemulsificação (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.....</p>	26

Tabela 7. Valores da espessura corneal (mm) no Oc e Ot, em pacientes da espécie canina, anteriormente ao procedimento cirúrgico de facoemulsificação (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020..... 27

Tabela 8. Valores da hexagonalidade celular endotelial (%) no Oc e Ot, em pacientes da espécie canina, anteriormente ao procedimento cirúrgico de facoemulsificação (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020..... 27

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem fotográfica demonstrando o posicionamento dos pacientes, sob contenção delicada, para realização da microscopia especular de não contato. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020..... 16
- Figura 2.** Graus de dificuldade do procedimento de facoemulsificação, quanto à incisão principal, incisão auxiliar, capsulorrexe, hidrodissociação, nucleodissociação, facoemulsificação e sutura corneal, no Oc e Ot, em pacientes da espécie canina. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020..... 19
- Figura 3.** Imagem fotográfica colhida de paciente da espécie canina, mostrando olho com opacidade da cápsula anterior e lente intraocular (LIO) centralizada, no M3. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020..... 20
- Figura 4.** Imagem fotográfica colhida de paciente da espécie canina, mostrando olho com sinéquias posteriores e lente intraocular (LIO) centralizada, no M3. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020..... 21
- Figura 5.** Imagem do endotélio corneal de um olho tratado, em M6, de paciente da espécie canina, à microscopia especular de não contato, obtida com Software Cell Count, sendo (A) Delimitação celular em modo automático e parâmetros correspondentes obtidos pelo equipamento, (C) mesma imagem em detalhe, asteriscos correspondem a erros grosseiros na delimitação celular do software em modo automático; (B) Delimitação celular após a correção manual e os parâmetros correspondentes obtidos, (D) mesma imagem em detalhe, onde se pode apreciar a maior coerência dos limites celulares após a correção manual. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020..... 26
- Figura 6.** Valores médios e erro padrão da média do coeficiente de variação (%), em pacientes da espécie canina do Oc e do Ot anteriormente ao procedimento de facoemulsificação M0 (PreOc; PreOt), e imediatamente a ele (M1), aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório (PostOc; PostOt). Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020..... 29

1. Introdução

O endotélio corneal é a camada celular mais interna da córnea. Regula a transparência da córnea por possuir ação de bomba fisiológica ativa controlando a deturgescência corneal. A capacidade regenerativa das células do endotélio corneal é limitada, sendo danificada por diferentes processos como a idade, processos inflamatórios e/ou traumáticos, a exemplo, os provocados durante a facoemulsificação, possibilitando o desenvolvimento de disfunção endotelial e perda da transparência corneal. Os fármacos inibidores de rho quinase (ROCK) constituem possível alternativa medicamentosa para a terapia regenerativa corneal, demonstrando, em diversas espécies, capacidade de estimular a proliferação de células endoteliais corneais diminuindo sua apoptose. Com a implementação intracameral de ROCK (Y-27632), espera-se diminuir possíveis alterações da celularidade endotelial, que possam afetar à transparência corneal como consequência de complicações pós-operatórias na facoemulsificação, como opção de trazer avanços na terapia regenerativa do endotélio corneal.

2. Revisão de Literatura

A catarata, que acomete animais mestiços e de raças puras (Whitley et al., 1993a; Glover e Constantinescu, 1997; Gelatt, 2007), podendo ser definida como a opacidade do cristalino, da sua cápsula ou de ambos, decorrente de alterações na arquitetura lamelar de suas fibras ou da cápsula lenticular (Barnett e Startup, 1985; Johnson e Miller, 1990; Glover e Constantinescu, 1997; Gelatt, 2007; Croix, 2008).

Cataratas podem ser classificadas levando-se em consideração referenciais como a idade do paciente (Whitley et al., 1993a; Gelatt, 2007), a localização da lesão na lente, seu estágio de desenvolvimento e suas causas suscitantas (Barnett e Startup, 1985; Fischer, 1989; Dziezyc, 1990; Johnson e Miller, 1990; Whitley et al., 1993a; Glover e Constantinescu, 1997; Gelatt, 2007).

Diferentes condições têm sido imputadas na gênese das cataratas, mas sua causa, em alguns casos, não é totalmente elucidada (Barnett e Startup,

1985; Davison e Nelms, 2007). Estudos apontam a radiação ultravioleta e a ação de espécies reativas de oxigênio (ERO), com estresse oxidativo (Sies, 1991; Barros et al., 1999), como as mais frequentes. Descobriu-se que a concentração de proteínas alteradas por processos oxidativos aumenta com a idade e é significativamente maior em lentes com catarata (Boscia et al., 2000; Williams e Munday, 2006).

Relativamente à localização anatômica na lente, as cataratas são classificadas em nucleares, corticais e em capsulares. Quanto ao grau de desenvolvimento, podem ser incipientes, imaturas, maduras e hipermaduras. Sobre a condição suscitante, podem ser hereditárias, nutricionais, tóxicas, inflamatórias, metabólicas e traumáticas (Barnett e Startup, 1985; Fischer, 1989; Dziezyc, 1990; Johnson e Miller, 1990; Whitley et al., 1993a; Glover e Constantinescu, 1997). Cataratas juvenis são mais comuns nas raças poodle, cocker spaniel, schnauzer e no pinscher miniatura, nos quais, particularmente, são frequentemente de caráter hereditário (Stades et al., 1999).

Classificam-se também as cataratas em primárias e em secundárias, sendo, as primárias, aquelas em que não há sinais de doença anterior no olho acometido e a lente é a única estrutura afetada. As secundárias têm, como causa de base, alterações de cunho sistêmico ou em outra estrutura ocular (Barnett e Startup, 1985).

Cataratas hereditárias primárias manifestam-se nas primeiras semanas ou meses de vida, e são progressivas. Nem todas, porém, culminam com o acometimento de toda lente. Quase sempre são bilaterais, mas não necessariamente simétricas. Cataratas hereditárias secundárias podem estar associadas à membrana pupilar persistente, à atrofia progressiva da retina, à luxação da lente ou ao glaucoma primário (Barnett e Startup, 1985; Barnett e Startup, 1988).

Alternativas terapêuticas de cunho medicamentoso já foram propostas. Por exemplo, a utilização da superóxido dismutase e do ascorbato citrato de zinco. Estudos, todavia, constataram que tais substâncias não oferecem benefícios. Os efeitos da administração local da n-acetil-carnosina em cães com catarata foram investigados. Demonstrou-se, por ação da substância, discreta diminuição da opacificação da lente em cataratas maduras (Williams e Munday, 2006).

Admite-se como único e efetivo o tratamento cirúrgico, cujo primeiro relato em cães se deu na Europa, por Moller, em 1886 e, posteriormente, por Berlin em 1887. Não obstante, ela só se popularizou como prática em veterinária a partir da década de 1950 (Whitley et al., 1993a).

A facectomia intracapsular foi abandonada desde há muito devido às suas intercorrências, sendo reservada a casos de luxação ou de subluxação da lente (Williams et al., 1996). A extracapsular predominou por anos, mas os resultados jamais atenderam ao ansiado (Dziezyc, 1990; Whitley et al., 1993b). Entre as causas da significativa inflamação suscitada por qualquer dos procedimentos, encontram-se particularidades não só da espécie e do paciente, mas das técnicas, que favorecem a exposição de quantitativos variáveis de proteínas da lente (Dziezyc, 1990).

Técnicas cirúrgicas para remoção da catarata foram modificadas para se aumentarem os percentis de sucesso, com mínimas intercorrências (Dziezyc, 1990; Davidson et al., 1991; Whitley et al., 1993b; Williams et al. 1996). Atualmente, o procedimento de escolha é a facoemulsificação, que consiste na fragmentação ultrassônica e na aspiração do material emulsificado, por pequena incisão corneal de cerca de 3,0 mm (Davidson et al., 1991; Nasisse et al., 1991; Bistner, 1992; Williams et al., 1996; Glover e Constantinescu, 1997; Jung et al. 2013). Introduzida por Kelman em 1967, ganhou notoriedade (Whitley et al., 1993a; Croix, 2008) e, nos últimos anos, a oftalmologia veterinária e médica dela têm se beneficiado pelos resultados que oferece (Williams et al., 1996; Glover e Constantinescu, 1997). Os efeitos, notadamente superiores, advêm de um procedimento cirúrgico rápido, da pequena incisão e da reparação tecidual precoce, como já comentado. Adjunto da menor inflamação pós-operatória, da melhor aspiração das massas corticais e da não descompressão da câmara anterior no curso da intervenção (Dziezyc, 1990). Dentre as complicações decorrentes, interpõem-se as uveítes, menos intensas, comparativamente a outras técnicas, o glaucoma pós-operatório, os descolamentos de retina (Sigle e Nasisse, 2006), a ruptura da cápsula posterior da lente (Johnstone e Ward, 2005) e alterações corneais decorrentes de danos ao endotélio (Hull, 1990; Moore et al. 2003; Rubowitz et al., 2003).

A transparência corneal depende da ausência de vasos sanguíneos, de pigmentos, de epitélio superficial anterior não queratinizado, da organização

das lamelas de colágeno no estroma (Gellat, 2003) e de seu relativo estado de desidratação (Teixeira et al., 2009).

O endotélio é a camada mais interna da córnea. Suas células atuam como bomba ativa, para remover e para transportar fluidos, regulando a hidratação da matriz estromal. Células endoteliais normalmente exibem padrão em mosaico hexagonal, dispostas sobre a membrana de Descemet (Gellat, 2003; Rodrigues et al., 2006).

Com o avançar da idade, o quantitativo de células endoteliais diminui (Rodrigues et al., 2006). Traumas cirúrgicos, uveíte e glaucoma corroboram com Slatter (2005). Andrade et al. (2010) ratificaram que a densidade de células endoteliais da córnea central é maior em cães jovens, enquanto maior quantitativo de células hexagonais é visto em cães adultos. Valores de referência para a densidade das células endoteliais em seres humanos diminuem a partir de 3400 células/mm² aos 15 anos e para 2300 células/mm² aos 85 anos (Yee et al., 1985), reduzindo-se ao longo da vida a uma taxa média de 0,6% ano (Bourne et al., 1997). Decorrem descompensação e edema quando os valores se encontram abaixo de 500 células/mm² (Cameron et al., 2001). Mostrou-se que a densidade endotelial em cães com menos de um ano é de, aproximadamente, 2600 células/mm², e que esses valores diminuem entre 1 e 9 anos, para 2300 a 2500 células/mm². Acima de 10 anos, eles caem para 1900 células/mm² (Gwin et al., 1982). Pigatto et al. (2006) observaram densidade endotelial média de 2555 células/mm² em cães com 6 anos de idade. A descompensação corneal e a incapacidade em remover água do estroma ocorrem quando a densidade das células endoteliais diminui para valores inferiores a 800 células/mm² (Slatter, 2005).

O endotélio corneal pode ser avaliado à microscopia especular (Yee et al., 1987; Abib e Barreto, 2001; Andrew et al., 2002; Andrade et al., 2011). Trata-se de método não invasivo (Pigatto et al., 2006) que permite identificar a densidade e a forma das células *in vivo* e em *ex vivo*, sem que se produzam artefatos ou danos na córnea. Em córneas normais, o endotélio é contínuo e as células são, em sua maioria, hexagonais (68%), podendo ainda apresentar cinco (17%), sete (11%), quatro (2%) e oito lados (2%). Em condições normais não há diferenças entre olhos direito e esquerdo de um mesmo indivíduo.

Células endoteliais centrais e periféricas não diferem, quanto à forma, em indivíduos sadios (Pigatto et al., 2008).

A espessura corneal varia entre espécies, raças, indivíduos e quanto à localização topográfica do seu habitat. Em geral, nos animais domésticos ela não ultrapassa a 1,5 mm, estando entre 0,60 e 1,5 mm (Gum et al., 1999). Segundo Andrade et al. (2010), a espessura da córnea é de $0,51 \pm 0,01$ mm em cães jovens e de $0,57 \pm 0,02$ mm nos adultos. Em leporinos, ela varia de 0,37 a 0,43 mm (Chan et al., 1983).

Desde a introdução de dispositivos médicos de alta energia, tem-se a preocupação e o interesse quanto aos efeitos que decorrem da geração de radicais livres (Topaz et al., 2002; Robowitz et al., 2003). Em 1976, McCarey et al. reportaram-se a lesões em células endoteliais da córnea associadas ao calor produzido por vibrações ultrassônicas, assim como por danos mecânicos resultantes de material nuclear e pela manipulação de instrumentais internamente ao olho (Polack e Sugar, 1976). Estudos atribuem a tais eventos a geração de microbolhas e de radicais livres (Topaz et al., 2002).

Pesquisas sobre intercorrências nocivas induzidas pela facoemulsificação em células endoteliais da córnea mostraram que parte dos danos é mediada por radicais livres. Radicais hidroxila foram encontrados na câmara anterior, no curso de procedimentos cirúrgicos. Verificou-se que eles interagem com quase todos os tipos de molécula (açúcares, aminoácidos, fosfolípidios e nucleotídeos) em células vivas (Takahashi et al., 2002).

Pesquisa realizada em 42 cães com idades variando entre 24 e 132 meses, portadores de catarata e submetidos à facoemulsificação, mostrou efeitos do procedimento sobre a densidade endotelial. Encontraram-se perdas corneais axiais da ordem de 22% (488 células/mm²), decorridos 30 dias da cirurgia (Gwin et al., 1983). Tais achados são similares aos encontrados por Rubowitz et al. (2003) e por Nemet et al. (2007), em coelhos, e por Padua et al. (2017), em cães.

Na facoemulsificação, o humor aquoso é, parcial e temporalmente, substituído por solução de irrigação. A solução é distribuída a uma taxa de 20 a 30 mL/min, para se evitar o sobreaquecimento ensejado pelo ultrassom e visando a facilitarem-se as manobras cirúrgicas. No entanto, removem-se

antioxidantes próprios do paciente que protegeriam tecidos oculares de danos decorrentes da ação de radicais livres (Cameron et al, 2001).

Publicações enfatizaram os efeitos de antioxidantes sobre células endoteliais, na facoemulsificação (Werblin, 1993; Hayashi et al., 1996; Rubowitz et al., 2003, Padua, 2017). Holst et al. (1993), por exemplo, mostraram diminuição do dano endotelial pela ação da superóxido dismutase adicionada à solução de irrigação, na facoemulsificação em coelhos. Outros estudos descreveram o ácido ascórbico como agente importante na proteção do olho contra espécies reativas de oxigênio geradas na câmara anterior (Varma, 1991; Barros et al., 1999; Biaggi et al., 2006). Rubowitz et al. (2003), por exemplo, encontraram redução na perda da celularidade endotelial de até 70% quando da adição do ácido ascórbico à solução *buffer* de irrigação, também em coelhos. Dados similares foram vistos na mesma espécie por Nemet et al. (2007). Os pesquisadores observaram que o ácido ascórbico é eficaz e seguro na redução de danos ao endotélio da córnea. Padua et al. (2017) encontraram, em cães, após a adição de 0,001M de ácido ascórbico estéril, diluído em 500 mL de solução salina balanceada, como solução de irrigação na facoemulsificação, menor perda da densidade celular decorridos 3 meses do procedimento cirúrgico.

Em consonância, estudos demonstram o efeito benéfico de um inibidor da Rho quinase (ROCK), na recuperação funcional de células do endotélio corneal (Okumura et al., 2009; Okumura et al., 2011; Okumura et al., 2012). A subfamília Rho de quinases é constituída por proteínas da superfamília Ras. São proteínas monoméricas com capacidade para clivar a guanina trifosfato (GTP). As GTPases Rho atuam no controle de processos celulares, como proliferação, diferenciação, apoptose, metabolismo lipídico, regulação do citoesqueleto, tráfego de membrana, adesão célula-matriz, migração e polarização célula-célula (Aznar et al., 2004; Boettner e Aelst, 2002). Elas ciclizam entre um estado ativo ligado em GTP, predominantemente associado às membranas celulares, e em um inativo ligado à guanosina difosfato (GDP), predominantemente livre no citoplasma. Três grupos de proteínas regulam o ciclo: o fator de troca de nucleotídeo de guanina (GEF), com 82 membros que catalisam a troca entre GDP por GTP, para gerar a forma ativada de Rho, capaz de reconhecer seus efetores *downstream* (Vega e Ridley, 2008; Malliri et

al., 2006); proteínas ativadoras de GTPases (GAPs), que compreendem 67 membros cuja função é acelerar a capacidade intrínseca de Rho para hidrolisar GTP, restaurando o estado ligado em GDP, ocasionando a inativação da GTPase; e os inibidores de dissociação de nucleotídeo guanina (GDIs), uma família com 3 membros (α , $-\beta$ e $-\gamma$ Rho GDI) que impedem a dissociação de algumas GTPases da família Rho e promovem a ativação de nucleotídeos (Nomanbhoy e Cerione, 1996).

Para se tornar ativada, a Rho necessita interagir com alguns efetores. As primeiras efetoras de Rho identificadas foram a ROCK I (ROK β ou p160ROCK) e a ROCK II (ROK α) (Leung. et al., 1995; Ishizaki et al., 2000; Liao et al., 2007). Elas podem ser ativadas pela própria Rho ou pelo ácido aracdônico, em resposta a vários agonistas.

As ROCKs compreendem um domínio serina-treonina quinase na região N-terminal, seguido pela região de ligação em Rho (RBD), região homóloga à plecstrina (PH), e um domínio rico em cisteína (CRD) na região C-terminal. Na forma inativa, os domínios PH e RBD interagem com o domínio quinase formando uma alça auto-inibitória. Estímulos exógenos capazes de ocasionar a ligação entre Rho ativa e a região RBD de ROCK ensejam a liberação do domínio quinase, ativando as ROCKs (Mueller et al., 2005). As ROCKs foram caracterizadas por induzirem fibras de estresse e adesões focais, mediante proteínas que regulam o citoesqueleto de actina, a contratilidade e a mobilidade celulares (Kimura et al., 1996; Olson et al., 2008). Considerando-se que o citoesqueleto de actina se associa aos complexos juncionais que respondem pela manutenção dos contatos célula-célula, observou-se que a inibição de ROCK aumenta a permeabilidade paracelular (Walsh et al., 2001) e reduz a marcação de E-caderina (Anderson et al., 2002). Estudos envolvendo a forma dominante negativa de ROCK em células renais de cães (MDCK) e o silenciamento gênico dessa quinase mostraram que a ROCK II, e não a ROCK I, desorganiza contatos célula-célula (Samarin et al., 2007).

O Y-27632 ([(+)-(R)-*trans*-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridil)-cicloexanocarboximida dihidroclorato]) é um inibidor farmacológico seletivo da ROCK, promissor no tratamento do câncer, da degeneração neuronal, da insuficiência renal, da asma, do glaucoma, da osteoporose, da disfunção erétil e de doenças do metabolismo relacionadas à resistência insulínica (Olson, 2008).

Ele é permeável na célula e compete com o sítio de ligação de ATP nas ROCKs I e II, inibindo-as. Okumura et al. (2013) avaliaram os efeitos do Y-27632 sobre o endotélio corneal de primatas não humanos, após indução de lesão. Observaram, em quatro semanas, aumento da densidade celular endotelial nas áreas central e periférica da córnea, com reversão do dano e recuperação funcional do tecido. Aparentemente, o fármaco inibiu a apoptose e promoveu proliferação de células endoteliais da córnea de macacos e de coelhos (Okumura et al., 2009; Okumura et al., 2011; Okumura et al., 2012). Estudo, utilizando colírio contendo o Y-27632, em seres humanos com disfunção endotelial, mostrou diminuição do edema da córnea em casos de disfunção endotelial (Okumura et al., 2012). Recentemente, em cães, demonstrou-se maior proliferação endotelial nos indivíduos tratados com Y-27632 na forma de colírio após indução de lesão endotelial, comparativamente à sua não utilização (Miyagi et al., 2019).

Análogos de Y-27632 já foram sintetizados, todavia seus mecanismos de ação se revelaram diferentes (Uehata et al., 1997). Outros inibidores de ROCK, como o Fasudil ou HA-1077, são empregados como agentes terapêuticos para prevenção de vasoespasmos cerebrais, após hemorragia subaracnóidea, e de doenças cardiovasculares e pulmonares, porém com menos seletividade (Shibuya et al., 2005; Liao et al., 2007). Em oftalmologia, outro inibidor de ROCK, o Y-39983, foi testado em modelos experimentais de glaucoma (Tokushige et al., 2007).

Aventa-se a hipótese de que o emprego de Y-27632 poderia minimizar danos às células endoteliais da córnea em olhos submetidos à facoemulsificação.

3. Justificativa e Objetivos

3.1 Justificativa

Desde a introdução da energia ultrassônica na cirurgia da catarata, efeitos nocivos sobre o endotélio corneal, têm sido notificados. Alia-se a limitada capacidade de regeneração destas células, comprometendo a transparência da córnea. Admite-se que parte dos danos causados estejam associados ao calor produzido por vibrações ultrassônicas, por condições mecânicas resultantes de material nuclear, pela manipulação de instrumentais

internamente ao olho, assim como pela geração de microbolhas e de radicais livres. Em um primeiro estudo (pesquisa intitulada “Efeitos do Acido Ascórbico Intracamerar Sobre o Endotélio Corneal e Sobre o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) no Humor Aquoso, em Cães Submetidos a Facoemulsificação” cujos resultados foram publicados na revista *Veterinary Ophthalmology* doi: 10.1111/vop.12490), analisou-se a ação do ácido ascórbico, confirmando seus efeitos protetores sobre o endotélio corneal, por diminuir a perda da celularidade e por promover migração compensatória e aumento do tamanho celular. No presente estudo, com a implementação por via intracamerar de Y-27632 pretendeu-se estimular a capacidade regenerativa endotelial em olhos de cães submetidos à facoemulsificação eletiva, diminuindo perdas celulares e abrindo perspectivas para a terapia regenerativa na córnea. Adotaram-se, como métodos de avaliação, parâmetros clínicos, microscopia especular de não contato e flaremetria a *laser*.

3.2 Objetivo geral

Avaliar o papel do Y-27632 sobre o endotélio corneal, visando-se à minimização de efeitos indesejáveis a esse endotélio na facoemulsificação.

3.3 Objetivos específicos

Acompanhar a evolução pós-operatória de olhos de cães com o uso de Y-27632, comparativamente à sua não utilização, na facoemulsificação. Serão quali-quantificados a inflamação e intercorrências, a pressão ocular e os danos ao endotélio corneal, utilizando-se da microscopia especular de não contato e a quantificação do *flare* à flaremetria a *laser*.

4. Material e Métodos

4.1 Pacientes – Critérios de inclusão

Foram contabilizados 20 olhos de 10 cães, machos ou fêmeas, com sete a 12 anos de idade, portando catarata senil bilateral, atendidos no Serviço de Oftalmologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Os pacientes selecionados passaram por exame oftálmico baseado nos testes dos reflexos, no da lágrima de Schirmer¹, na biomicroscopia com lâmpada em fenda², na gonioscopia³ e na tonometria de rebote⁴, na oftalmoscopia binocular indireta⁵ e na monocular direta⁶ (posteriormente à dilatação pupilar com midriático⁷), e no teste de tingimento pela fluoresceína sódica⁸. Empregaram-se, adjunto, testes subjetivos para avaliação da percepção visual, como o teste de ameaça, do labirinto, do algodão e do ofuscamento, somados às observações prestadas pelos tutores dos animais, quanto à deambulação e ao desvio de objetos. Selecionaram-se somente indivíduos com cataratas maduras, sem afecções concorrentes ou sequelas de inflamação.

Pacientes pré-selecionados foram submetidos a ultrassonografia ocular⁹ nos modos A e B. Relativamente ao modo B, o foram com o objetivo de se avaliar o tamanho da lente e buscando-se estimar o diâmetro da lente intraocular (LIOs) a ser implantada.

Eletrorretinografia¹⁰ (ERG) em *flash* e em *flicker*, de consoante com o *Dog Diagnostic Protocol* (Narfström et al., 2002), foi utilizada a fim de se identificarem retinopatias concorrentes, selecionando-se apenas pacientes eletrorretinograficamente normais.

Para a avaliação das condições clínicas gerais, foram realizados exame físico, contagem global de células sanguíneas, avaliação das funções hepática e renal e da glicemia, além da avaliação cardíaca por eletrocardiograma.

4.2 Grupos

Pacientes que atenderam aos critérios de inclusão foram submetidos a facoemulsificação bilateral. Um dos olhos (olho controle, n=10), aleatoriamente

¹ Teste de Schirmer – Ophthalmos, São Paulo, Brasil

² SL-450 – Nidek Co, Japan

³ Koeppe Medium Diagnostic Lens 18mm – Ocular Instruments Inc., USA

⁴ iCare TONOVET Plus –Revenio Group Corporation, Helsinki, Finland.

⁵ OHC – 3.3 – Opto Eletrônica S.A., São Carlos, SP, Brasil.

⁶ 7100 – C- Welch Allyn, Ontário, Canadá.

⁷ Mydriacyl – Alcon Laboratórios do Brasil Ltda.

⁸ Fluoresceína strips - Ophthalmos, São Paulo, Brasil.

⁹ UltraScan Imaging System – Alcon do Brasil S.A.

¹⁰ Handheld Multi-species ERG - Retvetcorp

designado por sorteio, recebeu apenas BSS, enquanto o olho adelfo (olho tratado, n=10) recebeu solução salina balanceada (BSS) e, imediatamente após a sutura das incisões corneais, foi realizada aplicação de 0,3mL contendo 100µmol/L de Y-27632 (Okumura et al., 2012) por via intracameral. (Quadro 1).

Quadro 1. Representação dos grupos da pesquisa de acordo à implementação de Y-27632, intracameral. Serviço de Oftalmologia – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” – FCAV – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, 2018.

	Olho controle	Olho tratado
Facoemulsificação	BSS	BSS
Após sutura corneal		Y-27632

BSS: solução salina balanceada

4.3 Procedimentos

4.3.1 Procedimentos pré-operatórios

O pré-operatório teve início com sete dias, instilando-se colírio à base de dexametasona associada à tobramicina¹¹, a intervalos regulares de seis horas. Empregou-se colírio de sulfato de atropina 1%¹² trinta minutos prévios ao procedimento cirúrgico. Utilizou-se flunixinina meglumina¹³, em dose única de 1 mg/kg, pela via intramuscular, trinta minutos antes do ato operatório. Para adaptação ao colar protetor, os pacientes já o recebiam nesta fase.

4.3.2 Procedimentos anestésicos

Após jejum alimentar e hídrico de doze e seis horas, respectivamente, empregou-se pré-anestesia com meperidina¹⁴, na dose de 0,005 mg/kg, pela

¹¹ Tobradex[®] - Alcon do Brasil.

¹² Atropina 1% - Allergan Produtos Farmacêuticos

¹³ Banamine – Schering Plough.

¹⁴ Fentanest – Cristália.

via intramuscular, associada a diazepam¹⁵, na dose de 0,3 mg/kg. Decorridos quinze minutos, realizou-se indução de anestesia geral com propofol¹⁶, na dose de 5 mg/kg, pela via intravenosa. Para a manutenção, empregou-se anestésico halogenado¹⁷, vaporizado em oxigênio, em circuito de reinalação semi-fechado. Empregou-se dessensibilização corneal com colírio de proximetacaína a 0,5%¹⁸.

4.3.3 Facoemulsificação

Os pacientes foram posicionados em decúbito dorsal e a área operatória tricotomizada. Para a antissepsia da superfície periorbital, empregou-se solução aquosa comercial de iodopirrolidona¹⁸ na proporção 1:1 nas pálpebras, e diluída na proporção 1:50, em solução salina¹⁹, para a superfície ocular.

Visando ao melhor posicionamento do olho e a diminuir a tensão da musculatura extra-ocular, realizou-se bloqueio neuro-muscular com brometo de rocurônio²⁰, na dose de 0,3 mg/kg, pela via intravenosa, e ventilação assistida. A técnica cirúrgica adotada foi a facoemulsificação bimanual, com incisões principal e auxiliar, ambas em córnea clara a, aproximadamente, 1,0 mm do limbo. A principal foi tunelizada, em posição 11 horas, utilizando-se bisturi angulado 3,2 mm²¹. A auxiliar, situada em posição 2 horas, confeccionada com auxílio de bisturi reto de 15 graus. A câmara anterior foi preenchida com corante de cápsula²² e lavada com BSS, para remoção de remanescentes do corante. Como soluções viscoelásticas, foram utilizados o sulfato de condroitina a 4%, acrescido do hialuronato de sódio a 3%²³, e hialuronato de sódio a 1%²⁴, em técnica “soft-shell” proposta por Arshinoff (1999). Com o auxílio de um cystítimo, fez-se uma incisão na cápsula anterior, seguida de capsulorrexe curvilínea contínua, com pinça de Ultrata. Com seringa acoplada a uma cânula de irrigação, realizou-se a hidrodissociação do núcleo, empregando-se BSS.

¹⁵ Diazepamil – Hipolabor.

¹⁶ Profolen – Blausiegel.

¹⁷ Isoforine – Cristália.

¹⁸ Anestalcon – Alcon Laboratórios do Brasil Ltda.

¹⁸ Laboriodine PVPI tópico – Laboratórios Biosintética

¹⁹ Solução fisiológica – Cloreto de sódio 0,9% - Baxter Hospitalar

²⁰ Esmeron – Akzo Organon Teknika

²¹ Surgical knife 3.2mm – Alcon labs.

²² Azul de tripan® – Ophthalmos.

²³ Viscoat – Alcon labs.

²⁴ Provisc – Alcon labs.

Para as facectomias, empregou-se facoemulsificador²⁵ e BSS acrescida de 1mL de epinefrina²⁶ 1:1000 e 1mL de heparina sódica²⁷. Com o pedal na posição 1 (estágio de irrigação), a ponteira da caneta de facoemulsificação foi introduzida na câmara anterior e no saco capsular. Empregou-se a técnica de “dividir e conquistar”, para a emulsificação e a aspiração do núcleo, podendo, se necessário, utilizar-se a função em bomba peristáltica. Para a aspiração das massas corticais e da substância viscoelástica remanescentes, empregou-se a função irrigação e aspiração.

Os pacientes receberam lente acrílica dobrável²⁸, posicionada no saco capsular, com a porção óptica centralizada e as hápticas inseridas no equador.

A incisão corneal foi suturada com pontos simples separados, não-perfurantes totais, empregando-se fio absorvível 9-0.²⁹ Em ato contínuo, no olho tratado (Ot), aplicou-se, intracameralmente, 0,3mL de Y-27632, na concentração de 100µmol/L.

4.3.4 Procedimentos pós-operatórios

Foram utilizados prednisona³⁰, por via oral, na dose de 1mg/Kg, a intervalos de 24 horas, por 15 dias consecutivos, com redução gradual da dose nos 15 dias subsequentes; colírio de dexametasona associada à tobramicina¹¹ a cada 4 horas por sete dias e a seguir a cada 8 horas, por 21 dias mínimos. Nepafenaco colírio 0,1%³¹, a cada 6 horas, por 30 dias, brinzolamida colírio 1%³², a intervalos de 12 horas, por sete dias, e atropina colírio 1%¹², a cada 12 horas, por três dias consecutivos. Todos os pacientes foram mantidos com colar do tipo Elizabethano por 15 dias mínimos.

²⁵ Facoemulsificador Universal II– Alcon do Brasil S.A

²⁶ Epinefrina - Cristália

²⁷ Heparina sódica – Ariston Ltda.

²⁸ 30-V 12,0/ 30-V 14,0 –Acrivet, Hennigsdorf, Germany

²⁹ Vicryl 9-0 – Ethicon.

³⁰ Meticorten – Schering Plough.

³¹ Nevanac – Alcon Laboratórios do Brasil Ltda.

³² Azopt- Alcon Laboratórios do Brasil Ltda.

4.4 Protocolos de avaliação

4.4.1 Facoemulsificação

Referenciais de cada ato cirúrgico, relativamente ao tempo de ultrassom (segundos), poder de ultrassom (%), vácuo (mmHg), fluxo de aspiração (cc/min), quantitativo de BSS e intercorrências cirúrgicas foram contabilizados. Graus de dificuldade quanto à incisão principal, incisão auxiliar, capsulorrexe, hidrodissociação, nucleodissociação, facoemulsificação e sutura corneal, foram quali-quantificados, segundo a escala *Nihill*, em leve, moderado e severo (Andrade et al., 2010).

4.4.2 Avaliação clínica

As avaliações foram conduzidas anteriormente ao procedimento cirúrgico (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório.

Avaliou-se o blefarospasmo, congestão, edema corneal, quemose, coloração e aspecto da íris, sinéquias, presenças de fibrina ou de membranas na câmara anterior e de alterações vítreo-retinianas, *flare* clínico e por flaremetria³³. Empregou-se critério subjetivo quali-quantitativo, em escala de 0 a 4, sendo 0 = ausência de manifestação do evento, 1 = manifestação discreta, 2 = manifestação moderada, 3 = manifestação severa. A pressão intraocular (PIO) foi avaliada em cada um dos momentos.

Testes subjetivos para avaliação da percepção visual, como o teste de ameaça, do labirinto, do algodão e do ofuscamento, somados às observações prestadas pelos tutores dos animais, quanto à deambulação e ao desvio de objetos, no pós-operatório, foram também considerados.

³³ FC-2000 Laser Flare Meter – Kowa, Japan

4.4.3 Microscopia Especular

A microscopia especular³⁴ foi realizada na região central da córnea. Contenção manual delicada foi utilizada (Figura 1). Para cada olho, três medidas foram realizadas e o valor médio foi calculado contabilizando-se 100 células em cada avaliação. As avaliações foram feitas anteriormente ao procedimento cirúrgico (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório. Estudaram-se a densidade das células endoteliais (DC; células/mm²), a área das células endoteliais (mm²), bem como espessura corneal (mm), a hexagonalidade e o coeficiente de variação do tamanho celular. Dados obtidos à microscopia especular foram coletados e, então, corrigidos manualmente com a finalidade de eliminar possíveis erros na delimitação das células endoteliais (Cambas Andreu et al., 2014). Valores obtidos foram transferidos para um *Software Cell Count*. A fim de facilitar-se a valoração das perdas celulares, valores de densidade das células endoteliais foram utilizados para se calcular a diferença entre as suas medias ($DM = DC \text{ pré-operatório} - DC \text{ pós-operatório}$; células/mm²) e as mudanças na contagem [$MC = (DM / DC \text{ pré-operatório}) \times 100$; %] das células, que informa sobre a porcentagem perdida.

³⁴ Specular microscope SP-3000 P[®], Topcom corporation, Japão.



Figura 1. Imagem fotográfica demonstrando o posicionamento de um pacientes, sob contenção delicada, para realização da microscopia especular de não contato. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.

4.4.4 Quantificação do Flare - “*Laser cell-flare meter*”.

Realizaram-se as avaliações, anteriormente ao procedimento cirúrgico (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório, empregando-se equipamento próprio para tal³⁵. Um feixe a *laser* de hélio-neon faz varredura da câmara anterior do olho operado registrando, numericamente, o quantitativo de *flare* (ph/ms).

4.5 Estatística

O tamanho da amostra (20 olhos de 10 cães) atende aos critérios estabelecidos por pesquisadores do Departamento de Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), Câmpus de Jaboticabal. Os critérios foram baseados

³⁵ FC-2000 Laser Flare Meter – Kowa, Japan.

na fórmula: $n=[Z\alpha/2\delta/d]^2$, sendo “d” fixado a um erro de estimativa de 5%; “ $Z\alpha/2$ ”, de valor fixo obtido em tabela de distribuição normal, com grau de confiança $1-\alpha=95\%$; e “ δ ”, correspondente aos desvios padrão de resultados prévios. Os dados foram agrupados por momentos, de consoante com o tempo cirúrgico. Projeções de valores médios e dos desvios padrão foram calculadas ajustando-se os modelos das variáveis estudadas.

Parâmetros de microscopia especular foram avaliados empregando-se ANOVA não paramétrica para Medidas Repetidas, de acordo com teste de normalidade Shapiro-Wilk (Montiani-Ferreira et al., 2004). Posteriormente, foram avaliados empregando-se *post-hock test* em *software* estatístico³⁶. Variáveis clínicas qualitativas (escores) foram avaliadas empregando-se *odds ratio* e teste exato de Fisher. Valores de P iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

5. Resultados

5.1 Pacientes

Foram submetidos à eletrorretinografia 21 pacientes, dentre os quais, 13 satisfizeram os critérios de inclusão da presente pesquisa e foram submetidos à facoemulsificação. Dois destes pacientes não foram conduzidos aos retornos nos dias indicados e foram excluídos da pesquisa. Uma paciente desenvolveu complicações pós-operatórias no Ot, decorrentes de um trauma por manejo inadequado, e foi retirada da pesquisa. A amostra final totalizou 20 olhos em 10 pacientes. (Tabela 1).

³⁶ Systat Software inc[®], San Jose, California, USA

Tabela 1. Identificação de pacientes da espécie canina submetidos à facoemulsificação, segundo raça, sexo e idade. Serviço de Oftalmologia – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” – FCAV – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, 2020.

Nome	Raça	Idade	Sexo
JUNIOR	MALTÊS	7	M
TOY	POODLE	12	M
BIBI	LHASA APSO	7	F
CISSA	POODLE	9	F
BELINHA	COCKER SPANIEL	9	F
PEDRO	POODLE	10	M
HANNA	POODLE	12	F
HABIBA	JACK RUSSEL TERRIER	8	F
BUD	POODLE	7	M
SARA	SRD	10	F
FIFI	SRD	8	F
SHAY	PASTOR ALEMÃO	7	F
CHIQUINHO	SHIH-TZU	11	M

Em azul - pacientes incluídos na pesquisa

Em laranja- pacientes excluídos da pesquisa

5.2 Protocolos da avaliação

5.2.1 Facoemulsificação

Para os olhos controles, o tempo de ultrassom variou entre 102 seg. a 420 seg. (média de $258 \pm 103,8$ seg.). Relativamente ao poder de ultrassom, ele foi de 60% a 70%. Quanto ao vácuo, as variáveis foram de 149 a 301 mmHg. O fluxo de aspiração foi de 25 cc/min, e o volume total de BSS variou de 150 a 1300 mL. Para os olhos tratados, o tempo de ultrassom foi de 84 seg. a 576 seg. (média de $330 \pm 141,9$ seg.). Relativamente ao poder de ultrassom, foi de 60% a 70%. Quanto ao vácuo, as variáveis foram de 149 a 300 mmHg. O fluxo de aspiração foi de 25 cc/min, e o volume total de BSS variou de 150 a 1300 mL.

As intervenções foram conduzidas, com graus variáveis de dificuldade técnica (Figura 2), sem representar, contudo, qualquer significância estatística. A incisão principal e a auxiliar foram conseguidas com nenhuma dificuldade.

Em oito olhos controles e em oito olhos tratados (80%), encontrou-se dificuldade de grau leve na execução da capsulorrexe. Não se encontrou aderência do material lenticular à cápsula lenticular, porém, em 80% dos pacientes observou-se opacidade da mesma (Figura 3). Encontrou-se dificuldade moderada (10%) e severa (20%) para a fratura do núcleo nas cataratas duras em Oc, e dificuldade moderada (10%) e severa (40%), em Ot que obrigaram a um maior tempo de ultrassom em cinco dentre os dez pacientes operados. A implantação das lentes deu-se sem qualquer óbice em todos os pacientes.

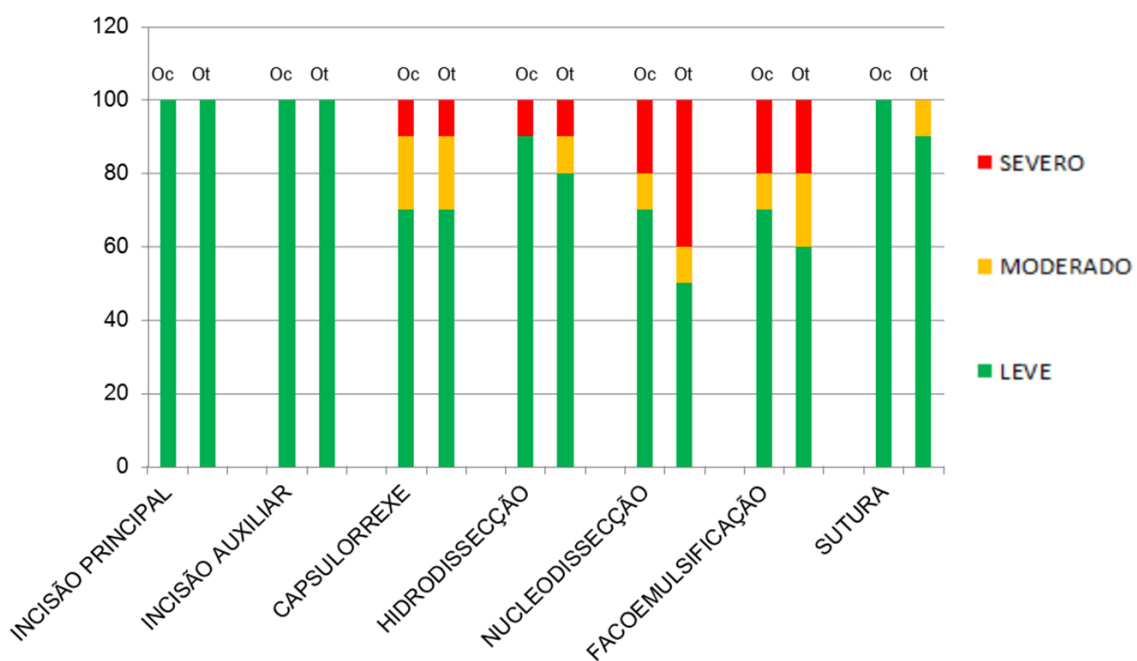


Figura 2. Graus de dificuldade do procedimento de facoemulsificação, quanto à incisão principal, incisão auxiliar, capsulorrexe, hidrodissecção, nucleodissecação, facoemulsificação e sutura corneal, no Oc e Ot, em pacientes da espécie canina. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.

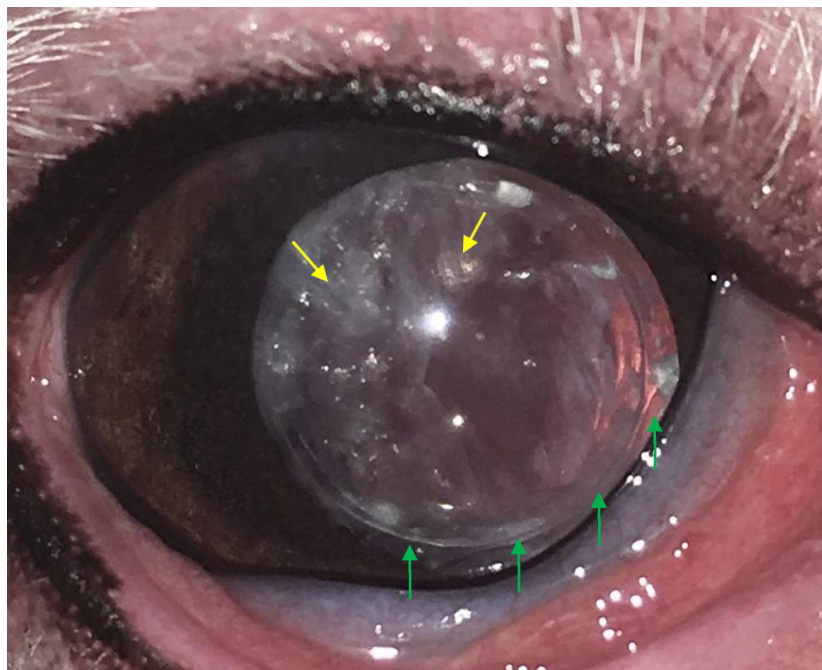


Figura 3. Imagem fotográfica colhida de paciente da espécie canina, mostrando olho com opacidade da cápsula anterior (seta amarela) e lente intraocular (LIO) centralizada (seta verde), no M3. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.

5.2.2 Avaliação clínica

Fotofobia e blefarospasmo foram observados em M1, ocorrendo de forma intensa em três olhos (30%); moderada em quatro olhos (40%) e discreta em dois olhos (20%) do Oc. Em Ot ocorreram de forma intensa em um olho (10%); moderada em três olhos (30%) e discreta em seis olhos (60%). Os sinais regrediram em sua quase totalidade em M2, permanecendo de modo discreto em apenas um olho (10%) do Oc, para se tornarem ausentes nos demais momentos.

Observou-se congestão conjuntival discreta em sete olhos (70%) do Oc em M1. Em M2 notou-se discreta em um olho (10%) e moderada em outro (10%) no Oc, com regressão para discreta em apenas um olho (10%), em M3 e M4 até tornar-se ausente nos demais momentos. Relativamente ao Ot, observou-se o sinal ocorrendo de forma discreta em nove olhos (90%), em M1, e em um olho (10%), em M2, M3, M4 e M5 tornando-se ausente após este momento.

No Oc, quatro olhos (40%), em M1, e um olho (10%), em M2 apresentaram edema corneal difuso de manifestação discreta, desaparecendo

nos momentos seguintes de avaliação. Com relação ao Ot, o evento ocorreu de forma discreta em quatro olhos (40%) em M1 e um olho (10%) em M2, tornando-se ausente até M6. Observou-se edema corneal limitado aos sítios da incisão, regredindo ao final do período de avaliação, em 100% dos olhos do Oc e do Ot, restando mácula cicatricial discreta nas áreas das incisões corneais. Quemose não foi observada em qualquer dos grupos ou momentos avaliados.

Sinéquias posteriores foram observadas. Em ambos Oc e Ot, o foram em M2, de forma discreta em cinco (50%) e moderada em um dos olhos (10%) (Figura 4), permanecendo presentes até M6.

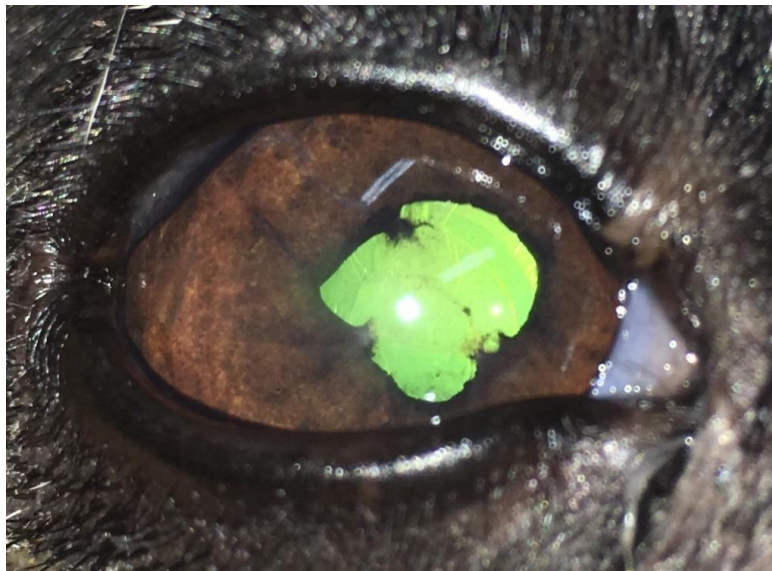


Figura 4. Imagem fotográfica colhida de paciente da espécie canina, mostrando olho com sinéquias posteriores (setas) e lente intraocular (LIO) centralizada, no M3. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.

Membranas foram observadas de maneira discreta em três olhos (30%) e de maneira moderada em outros três olhos (30%) do Oc em M1. Regrediram para discreta em cinco olhos (50%) e moderada em um olho (10%) em M2. Em M3, três olhos apresentavam manifestação discreta (30%) e um olho (10%) moderada. Em M4 e M5, dois olhos ainda apresentavam manifestação discreta (20%), tornando-se ausente a partir de M6. Em Ot as membranas foram observada em três olhos de forma discreta (30%) e três olhos de forma moderada (30%) em M1. Regrediram para discreta em cinco olhos (50%) e

moderada em um olho (10%) em M2. Em M3, três olhos apresentavam manifestação discreta (30%), e a partir de M4, dois olhos continuaram a apresentar a manifestação de forma discreta (20%), estando ausentes em M6.

Degeneração vítrea discreta foi observada bilateralmente em um paciente desde M0. O *flare*, à clínica, ocorreu em manifestação discreta em três dos olhos (30%) a partir do M1, tornando-se ausente nos demais momentos, em Oc. Em Ot, o evento deu-se em quatro olhos, de forma discreta (40%), em M1, diminuindo para 10% em M2 e M3, para tornar-se ausente a partir de M4. Os resultados do estudo estatístico, quanto aos eventos clínicos, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Intensidade/escore de referenciais da avaliação clínica no Oc e no Ot em pacientes da espécie canina anteriormente ao procedimento cirúrgico de facoemulsificação (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.

Sinal Clínico	discreto				moderado				severo			
	Oc	Ot	OR	P	Oc	Ot	OR	P	Oc	Ot	OR	P
blefaroespasm												
M1	2	6	2,6	0,6543	4	3	1,2857	0,9058	3	1	0,4286	0,7034
M2	1	0	0,2698	0,4402								
congestão												
M0	6	8	2	0,5134								
M1	7	9	2,5714	0,4758								
M2	1	1	0,875	0,9293	1	1	0,875	0,9293				
M3	1	1	0,8889	0,9372								
M4	1	1	0,8889	0,9372								
M5	0	1	3	0,5172								
edema												
M1	4	4	0,8333	0,5172								
M2	1	1	0,8889	0,9372								
sinéquias												
M2	5	5	0,75	0,7717	1	1	0,75	0,8579				
M3	5	5	0,75	0,7717	1	1	0,75	0,8579				
M4	5	5	0,75	0,7717	1	1	0,75	0,8579				
M5	5	5	0,75	0,7717	1	1	0,75	0,8579				
M6	5	5	0,75	0,7717	1	1	0,75	0,8579				
fibrina												
M1	3	3	0,75	0,7969	3	3	0,75	0,7969				
M2	5	5	0,75	0,7717	1	1	0,75	0,8579				
M3	3	3	1	1	1	1	0,75	0,8579				
M4	2	2	0,875	0,9056								
M5	2	2	0,875	0,9056								
alterações vítreo-retinianas												
M0	1	1	0,8889	0,9372								
M1	1	1	0,8889	0,9372								
M2	1	1	0,8889	0,9372								
M3	1	1	0,8889	0,9372								
M4	1	1	0,8889	0,9372								
M5	1	1	0,8889	0,9372								
M6	1	1	0,8889	0,9372								
flare clínico												
M1	3	4	1,3333	0,7638								
M2	0	1	3	0,5172								
M3	0	1	3	0,5172								

A odds ratio foi calculada apenas para os sinais clínicos presentes ou positivos, respeitando-se a intensidade/escore da manifestação e o momento no qual ela foi observada. Sinais clínicos ausentes em qualquer momento da avaliação não foram avaliados.

5.2.3 Quantificação do Flare – “Laser cell-flare meter”

O quantitativo de *flare* (ph/ms) à flarefotometria a *laser*, encontra-se apresentado na Tabela 3. Valores mais elevados foram observados no pós-operatório imediato, em pacientes do Oc, com aumento significativo do *flare* entre os momentos M0 e M2 ($P<0,001$) e M0 e M3 ($P<0,05$). Em Ot, esses valores mostraram-se mais intensos em M2, reduzindo-se significativamente em M5 ($P<0,05$) e M6 ($P<0,001$). Não se observou diferença entre os grupos.

Tabela 3. Valores de *flare* (ph/ms) de Oc e Ot, em pacientes da espécie canina, anteriormente ao procedimento cirúrgico de facoemulsificação (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.

Momento	Flare (ph/ms)	
	Oc	Ot
M0	2,94 ± 0,87 ^{a***;b*}	12,2 ± 6,3 ^{c**}
M1	83,28 ± 54,15	108 ± 37,38
M2	46,26 ± 6,91 ^{a***;}	118,5 ± 30,24 ^{c**;d*;e**}
M3	31,01 ± 6,91 ^{b*}	45,18 ± 14,87
M4	17,59 ± 4,58	12,51 ± 4,07
M5	15,23 ± 3,03	10,34 ± 1,77 ^{d*}
M6	11,29 ± 1,64	8,26 ± 1,35 ^{e**}

Dados foram expressos como média±erro padrão

* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$. Letras diferentes apresentam diferença estatística entre os momentos de cada grupo

Valores médios e desvio padrão da PIO em M0 do Oc foram de 14,11 ± 2,46mmHg. No Ot foram de 14,73 ± 1,94mmHg. Em M1 apreciou-se redução mais acentuada em olhos tratados, comparativamente ao controle, sendo 15,11 ± 1,57mmHg no Oc e 12,36 ± 0,84mmHg no Ot, sem representar, todavia, diferença estatisticamente significante. Nos demais momentos notou-se maior estabilização dos valores (M2, 15,22 ± 0,97mmHg e 15,5 ± 0,91mmHg; M3, 15 ± 0,96mmHg e 16,33 ± 0,83mmHg; M4, 15,38 ± 1,12mmHg e 15,67 ± 0,86mmHg; M5, 16,22 ± 0,76mmHg e 16,6 ± 0,62mmHg e M6, 15 ± 0,68mmHg e 16 ± 0,75mmHg, respectivamente no Oc e no Ot). A PIO

apresentou-se dentro dos valores de normalidade em todos os momentos avaliados (Tabela 4).

Tabela 4. Valores da Pressão Intraocular (PIO; mmHg) de Oc e Ot, em pacientes da espécie canina, anteriormente ao procedimento cirúrgico de facoemulsificação (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.

Pressão Intraocular (mmHg)		
Momento	Oc	Ot
M0	14,11 ± 2,46	14,73 ± 1,94
M1	15,11 ± 1,57	12,36 ± 0,84
M2	15,22 ± 0,97	15,5 ± 0,91
M3	15 ± 0,96	16,33 ± 0,83
M4	15,38 ± 1,12	15,67 ± 0,86
M5	16,22 ± 0,76	16,6 ± 0,62
M6	15 ± 0,68	16 ± 0,75

Dados foram expressos como média±erro padrão

5.2.4 Microscopia Especular

Dados obtidos nas imagens à microscopia especular foram coletados e, então, corrigidos de forma manual. Observaram-se erros grosseiros na delimitação celular e tendência a sobrestimar-se a contagem de células endoteliais quando o software era utilizado em modo automático (Figura 5).

Resultados quanto à densidade de células endoteliais (DC; células/mm²) nos diferentes momentos, aparecem na Tabela 5. Não foram encontradas diferenças significativas entre Oc e Ot ou entre os momentos das avaliações. Observaram-se discretas diferenças entre as médias e mudanças nas contagens em todos os momentos, não representando, todavia, perdas significativas.

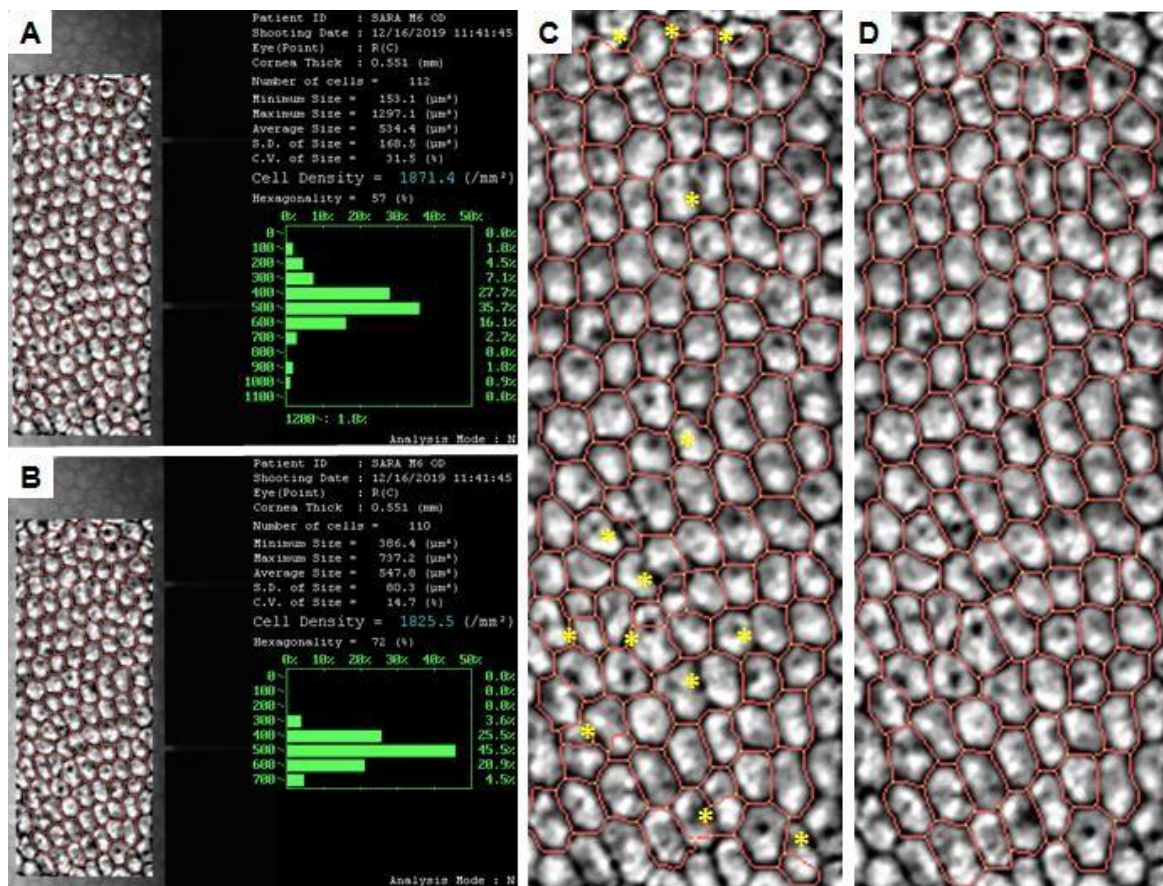


Figura 5. Imagem do endotélio corneal de um olho tratado, em M6, de paciente da espécie canina, à microscopia especular de não contato, obtida com Software Cell Count, sendo (A) Delimitação celular em modo automático e parâmetros correspondentes obtidos pelo equipamento, (C) mesma imagem em detalhe, asteriscos correspondem a erros grosseiros na delimitação celular do software em modo automático; (B) Delimitação celular após a correção manual e os parâmetros correspondentes obtidos, (D) mesma imagem em detalhe, onde se pode apreciar a maior coerência dos limites celulares após a correção manual. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.

Tabela 5. Valores da densidade celular endotelial (DC; células/mm²), Diferença entre as médias (DM; células/mm²) e Mudança na contagem (MC; %) no Oc e Ot, em pacientes da espécie canina, anteriormente ao procedimento cirúrgico de facoemulsificação (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.

Momento	DC (células/mm ²)		Momentos	DM (células/mm ²)		MC (%)	
	Oc	Ot		Oc	Ot	Oc	Ot
M0	2257 ± 49,19	2197 ± 61,71					
M1	2375 ± 95,80	2206 ± 107,9	M0 X M1	-118	-9	5,2	0,4
M2	2115 ± 84,15	2141 ± 74,82	M0 X M2	142	56	6,3	2,5
M3	2037 ± 80,75	2041 ± 79,17	M0 X M3	220	156	9,7	7,1
M4	2013 ± 59,74	1997 ± 76,80	M0 X M4	244	200	10,8	9,1
M5	1998 ± 33,83	1917 ± 56,86	M0 X M5	259	280	11,5	12,7
M6	1991 ± 46,67	2034 ± 50,83	M0 X M6	266	163	11,8	7,4

Dados foram expressos como média±erro padrão

Os resultados quanto à área (µm²) das células endoteliais corneais encontram-se na Tabela 6. A área celular aumentou em maior proporção entre os momentos M1 e M4, e M1 e M5, no Oc. Em G2 não houve aumento significativo entre os momentos de avaliação.

Tabela 6. Valores da área das células endoteliais (µm²) no Oc e no Ot em pacientes da espécie canina, anteriormente ao procedimento cirúrgico de facoemulsificação (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.

Momento	Área das células endoteliais (µm ²)		Diferença entre as médias (µm ²)		
	Oc	Ot		Oc	Ot
M0	448,1 ± 10,07	459,3 ± 13,63	Momentos		
M1	411,1 ± 11,24 ^{a;b**}	460,6 ± 23,53	M0 X M1	37	-1,3
M2	458,5 ± 14,08	473,5 ± 18,2	M0 X M2	-10,4	-14,2
M3	497,9 ± 20,18	496 ± 20,23	M0 X M3	-49,8	-36,7
M4	505,2 ± 16,96 ^{a*}	509,5 ± 20,64	M0 X M4	-57,1	-50,2
M5	518,6 ± 19,8 ^{b**}	527,6 ± 15,78	M0 X M5	-70,5	-68,3
M6	504,5 ± 11,62	494,3 ± 12,49	M0 X M6	-56,4	-35

Dados foram expressos como média±erro padrão

*P<0,05; ** P<0,01; ***P<0,001. Letras diferentes apresentam diferença estatística entre os momentos de cada grupo

Resultados relativos à espessura corneal (mm) encontram-se na Tabela 7. Significâncias não foram observadas em qualquer dos momentos avaliados.

Tabela 7. Valores da espessura corneal (mm) no Oc e Ot, em pacientes da espécie canina, anteriormente ao procedimento cirúrgico de facoemulsificação (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.

Espessura Corneal (mm)					
Momento	Oc	Ot	Diferença entre as médias (mm)		
M0	0,558 ± 0,020	0,563 ± 0,015	Momentos	Oc	Ot
M1	0,588 ± 0,016	0,610 ± 0,042	M0 X M1	-0,030	-0,037
M2	0,584 ± 0,024	0,602 ± 0,019	M0 X M2	-0,025	-0,038
M3	0,583 ± 0,030	0,574 ± 0,023	M0 X M3	-0,024	-0,010
M4	0,547 ± 0,028	0,536 ± 0,032	M0 X M4	0,012	0,028
M5	0,548 ± 0,018	0,530 ± 0,020	M0 X M5	0,010	0,034
M6	0,547 ± 0,021	0,512 ± 0,027	M0 X M6	0,012	0,052

Dados foram expressos como média±erro padrão

Os resultados quanto à hexagonalidade celular endotelial (%) encontram-se na Tabela 8. Significâncias não foram observadas em qualquer dos momentos avaliados.

Tabela 8. Valores da hexagonalidade celular endotelial (%) no Oc e Ot, em pacientes da espécie canina, anteriormente ao procedimento cirúrgico de facoemulsificação (M0), imediatamente a ele (M1) e aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.

Hexagonalidade (%)					
Momento	Oc	Ot	Diferença entre as médias (%)		
M0	68,23 ± 2,3	63,18 ± 2,0	Momentos	Oc	Ot
M1	63,69 ± 3,6	56,08 ± 5,1	M0 X M1	4,54	7,1
M2	57,81 ± 4,0	60,97 ± 3,0	M0 X M2	10,42	2,21
M3	63,51 ± 6,0	58,17 ± 4,5	M0 X M3	4,72	5,01
M4	61,09 ± 3,1	60,08 ± 3,0	M0 X M4	7,14	3,1
M5	66,4 ± 3,0	62,85 ± 1,7	M0 X M5	1,83	0,33
M6	70,15 ± 0,8	66,56 ± 2,9	M0 X M6	-1,92	-3,38

Dados foram expressos como média±erro padrão

O coeficiente de variação (%), relativamente a M0, foi de $23,35\pm 1,584\%$ no Oc e de $23,77\pm 0,687\%$ no Ot. Considerando os resultados médios obtidos em cada momento no pós-operatório, encontraram-se $26,81\pm 1,525\%$ no Oc e $26,88\pm 1,058\%$ no Ot. Não houve aumentos significativos, relativamente ao pré-operatório na comparação com os resultados vistos no pós-operatório, em ambos os grupos (Figura 6).

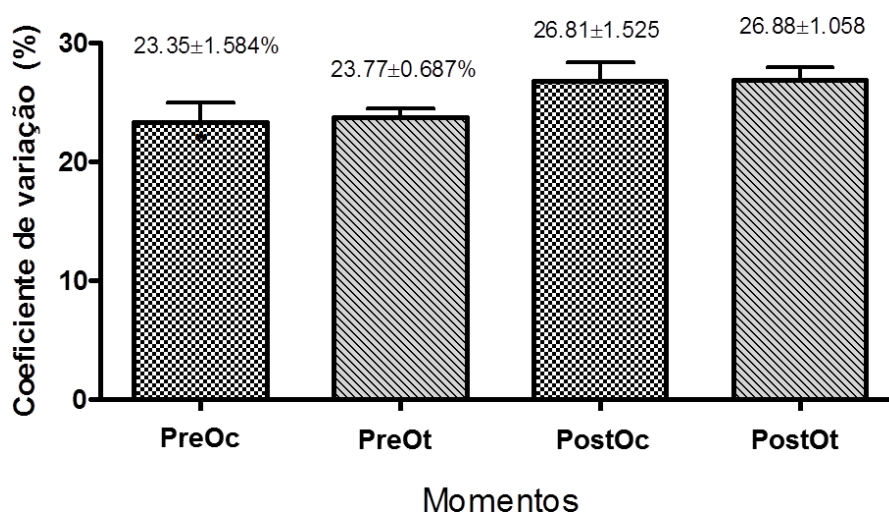


Figura 6. Valores médios e erro padrão da média do coeficiente de variação (%), em pacientes da espécie canina do Oc e do Ot anteriormente ao procedimento de facoemulsificação M0 (PreOc; PreOt), e imediatamente a ele (M1), aos sete (M2), 14 (M3), 28 (M4), 60 (M5) e 90 (M6) dias de pós-operatório (PostOc; PostOt). Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.

Devido ao blefarospasmo observado nos pacientes no pós-cirúrgico imediato (M1), interpuseram-se dificuldades na obtenção de imagens da área central da córnea, em todos os pacientes.

6. Discussão

Com o advento da instrumentação ultrassônica, a cirurgia de catarata foi significativamente modificada. Embora muitas vantagens sejam derivadas da facoemulsificação, danos às células endoteliais corneais (CECs), podem, ainda representar complicação grave (Gwin et al., 1982;1983).

Disfunções endoteliais em cães com alteração da homeostase funcional das CECs, com consequente perda da transparência corneal, são observadas, com comportamento similar aos descritos para CECs em humanos. Evidencia-se, como exemplo, a Distrofia Endotelial de Fuchs (FECD) (Thomasy et al., 2016a), indicando que o estudo do efeito dos inibidores de rho quinase no comportamento dessas células podem beneficiar ambas espécies (Miyagi, et al., 2019). Pesquisas recentes demonstraram que os inibidores de rho quinase são capazes de estimular a proliferação e migração de CEC, e diminuir a apoptose dessas células *in vitro* e *in vivo* (Okumura et al., 2009; 2016). Em um estudo clínico, a aplicação de CEC cultivadas *in vitro* com associação de Y-27632 contribuiu para o aumento na densidade de células endoteliais e melhora da acuidade visual em pacientes humanos com ceratopatia bolhosa (Kinoshita et al., 2018). De maneira similar, a utilização tópica de Y-27632 se mostrou benéfica para o reestabelecimento da transparência corneal em modelos animais com lesões endoteliais induzidas, ensejando diminuição do edema corneal, reparação endotelial mais rápida e maior densidade endotelial, um mês após o tratamento, sugerindo que sua utilização por essa via auxilia na recuperação morfológica e funcional de CECs (Okumura et al., 2011; 2013; Miyagi et al., 2019).

Pesquisas apontaram para benefícios quanto à implementação de antioxidantes, como o ácido ascórbico intracamerar na proteção contra a ocorrência de danos causados pelo estresse oxidativo (Varma et al., 1982; Barros et al., 1999), notadamente ao endotélio corneal durante o procedimento de facoemulsificação (Rubowitz et al., 2003; Nemet et al., 2007; Padua et al., 2017). Não se encontraram estudos clínicos ou publicações relativas à utilização de fármacos inibidores de rho quinase por via intracamerar, *in vivo*, durante a facoemulsificação.

Nesta pesquisa, estudaram-se os efeitos da aplicação intracamerar de 0,3ml de Y-27632, na concentração de 100µmol/L, comparado a não utilização, em cães com catarata senil, visando-se à minimização de efeitos indesejáveis ao endotélio corneal na facoemulsificação. A eleição do olho adelfo como controle permite melhor avaliação de variáveis individuais, (Yang et al., 2019) como níveis de excitação dos pacientes à avaliação, “status” hormonal, número

de receptores farmacológicos e outros fatores capazes de influenciar os parâmetros avaliados.

Relativamente à metodologia adotada, o protocolo anestésico atendeu ao pretendido. Diferentemente do homem, em cães é habitual o emprego da anestesia geral e o de bloqueador neuromuscular a fim de promover centralização e acinesia do bulbo ocular (Wilkie e Colitz, 2007; Kim et al., 2008). O bloqueador neuromuscular utilizado (pancurônio) foi aplicado a dose efeito, diluindo-se a dose em seringa de 5mL. Tal protocolo, assim como relatado por Teixeira (2003) e Padua et al. (2017), possibilitou centralização do bulbo ocular, por tempo adequado, não induzindo apneia em qualquer dos pacientes.

No que diz respeito ao procedimento cirúrgico, buscaram-se as mesmas condições nos dois grupos, relativamente ao tempo (segundos), ao poder de ultrassom (%), ao de vácuo (mmHg) e ao fluxo de aspiração (cc/min). O tempo médio das facoemulsificações, na comparação com outros autores, foi similar ao reportado por Özgencil (2005), que relata média de 318 segundos em cataratas maduras, e Padua (2017) que relata média de 268,5 e 280,5 segundos respectivamente em seus grupos controle e tratado. Entretanto, foi menor do que a média reportada por Klein (2011) e Martins (2011), que obtiveram tempo médio de 430,2 seg. e 473,4 seg., respectivamente. A busca por menor tempo cirúrgico é condição importante para um bom resultado final, no entanto, tal diferença poderia ser influenciada por fatores intrínsecos a intervenções desta natureza, como à experiência do cirurgião, o protocolo utilizado, e às condições da lente e dos equipamentos utilizados.

Sobre o quantitativo de BSS utilizado na facoemulsificação, sabe-se que o mesmo varia em função da dureza do núcleo cataratoso (Nasisse, 1991). O volume médio utilizado foi maior ao do reportado por Özgencil (2005), que empregou, em média, 300 mL, mas inferior ao do reportado por Martins (2008), cuja média foi de 700 mL. Tempos de irrigação longos, taxas de fluxo elevadas (acima de 50 cc/min), e grandes volumes de irrigação podem ser traumáticos para o endotélio corneal (Hejny e Edelhauser, 2005). Na presente pesquisa, não se podem atribuir variações entre os grupos uma vez que ultrassom e

volume de BSS não diferiram estatisticamente entre eles. A facofragmentação fora sempre realizada com o fragmento preso à extremidade da caneta, diminuindo efeitos da mobilização de energia constante. O fluxo de aspiração foi de 25 cc/min, não divergindo do que se considera como adequado (Hejny e Edelhauser, 2005).

Visando-se a proteção do endotélio corneal contra lesões mecânicas causadas pelo ultrassom, foi utilizada associação de dispositivos visco-cirúrgicos oftálmicos (DVOs), um dispersivo e um coesivo, em técnica *soft shell* (Arshinoff, 1999; 2000; Kara; Takahashi et al., 2002). Em cada um dos procedimentos cirúrgicos, graus variáveis de dificuldade técnica foram encontrados. Perceberam-se intercorrências na consecução das capsulorrexes, que poderiam ser atribuídas à fibrose capsular anterior, fruto da proliferação de membrana fibrosa subcapsular, por transformação do epitélio mesenquimal (Chandler et al., 2005). Consideram-se, esses eventos, como complicações intraoperatórias comuns em cataratas maduras (Bernays e Peiffer, 2000). A dificuldade, encontrada em alguns casos na hidrodissociação pode também ser atribuída às mesmas condições, por aderência do material lenticular à cápsula, dificultando a sua separação e, como consequência, a fratura do núcleo.

Por permitir um segundo instrumento, optou-se pela facoemulsificação pela técnica bimanual, possibilitando-se o controle da lente no saco capsular no instante da fragmentação e aspiração. A fragmentação foi realizada empregando-se a técnica “dividir e conquistar”, que permite esculpir núcleos duros e aspirá-los à distância segura do endotélio corneal e da cápsula posterior (Buratto et al., 2003).

Não obstante às inúmeras vantagens da facoemulsificação, opacidades capsulares contribuem para diminuir os índices de sucesso pós-operatórios, uma vez que se manifestam a uma frequência de até 100% nos cães afácicos (Bras et al., 2006; Sigle e Nassis, 2006; Chandler et al., 2010). Na presente pesquisa observou-se opacidade capsular em 80% do total dos olhos avaliados. No entanto, visão funcional foi vista em 100% dos olhos em todos os momentos pós-operatórios avaliados.

Relativamente aos procedimentos pré e pós-operatórios, seguiu-se o adotado pelos principais centros, com algumas poucas modificações. A frequência e o período das administrações de fármacos buscaram atender a protocolos nacionais e a internacionais (Gelatt, 2007; Honsho et al., 2007; Martins, 2008). O emprego de fármacos para controle de PIO, aliado a cuidados vigorosos quanto à aspiração de material viscoelástico, contribuíram para que se minimizassem condições de hipertensão ocular pós-operatória. O glaucoma tem sido definido como um aumento na PIO, acompanhada por alterações intraoculares com surgimento no pós-operatório imediato, até 72 horas após o procedimento cirúrgico (Biros et al., 2000; Sigle e Nasisse, 2006). Klein et al., 2011 encontraram correlação entre a idade e a probabilidade de desenvolvimento de glaucoma no pós-operatório, sendo 1,88 vezes maior para cada ano de vida do paciente. No presente estudo, não foram observadas diferenças na PIO entre os grupos experimentais, e complicações relacionadas à hipertensão ocular não foram observadas em nenhum dos momentos avaliados. Reconhece-se a elevação da PIO como uma das complicações agudas, estando relacionada principalmente à presença de DVOs, que oferecem resistência mecânica à drenagem do humor aquoso (Munger, 2009). Sabe-se que a elevação da PIO pode sobrecarregar a função bombadora do endotélio, resultando em edema corneal (Steinert, 1995). Irrigação e aspiração criteriosas reduzem a ocorrência de tais eventos (Jaffe, 1990).

O edema corneal, bem como os valores de espessura corneal, mostraram-se com intensidade semelhante em ambos os grupos. Edema corneal foi observado de maneira discreta no pós-operatório imediato, e tornou-se ausente após sete dias (M2) da facoemulsificação. Acredita-se que fatores como a energia ultrassônica, o turbilhonamento da solução de irrigação, formação de microbolhas (Pacífico, 1994; Topaz et al., 2002), manipulação cirúrgica intraocular, a implantação de LIOs (Teixeira, 2003), danos gerados às células endoteliais (Hayashi et al., 1996), assim como radicais livres, são os mais responsabilizados por tal fenômeno (Holst et al., 1993). No estudo realizado por Conceição (2014), observou-se edema de córnea por até 180 dias após facoemulsificação. Gilger et al. (1993) reportaram maior ocorrência de edema corneal transitório em olhos de cães pseudofácicos,

comparativamente a olhos afácicos. Edema corneal limitado às áreas de incisão e leucoma cicatricial, como identificado em ambos os grupos, são intercorrências esperadas em acessos via córnea clara (Maurice, 1970).

No presente estudo, não foram observadas úlceras corneais, deiscências ou infecção em quaisquer dos pacientes. Fotofobia e blefarospasmo ocorreram mais presencialmente até M2, sem diferença entre os grupos. Admite-se que tal ocorrência se deva à estimulação de terminações nociceptoras na superfície ocular (Waring, 1984) juntamente às uveítes decorrentes do trauma cirúrgico (Kern, 1990). À similitude do encontrado por Andrade (2011), congestão conjuntival foi evidenciada até M5 (60 dias após facoemulsificação), a partir do qual se tornou ausente. Trata-se de evento comum nas cirurgias intraoculares (Munger, 2009), em que medidas terapêuticas pré e pós-operatórias, notadamente anti-inflamatórias locais e sistêmicas, estão indicadas (Gelatt, 2007; Munger, 2009). Além da congestão decorrente do procedimento cirúrgico, a hiperemia conjuntival leve vista em 90% dos olhos em Ot no pós-operatório imediato pode estar também relacionada às vasodilatação e ao relaxamento de musculatura lisa associada aos inibidores de ROCK (Uehata et al., 1997; Yang et al., 2019).

Sinéquias apresentaram-se com intensidade semelhante em ambos os grupos, bem como os valores de *flare* obtidos, onde não se evidenciaram diferenças entre os grupos. Alterações vítreo-retinianas foram observadas bilateralmente em apenas um paciente, desde o momento M0, o qual não ensejou intercorrências cirúrgicas e não variou em intensidade no decorrer das avaliações. Hifema não foi observado em qualquer dos pacientes operados. Trauma iatrogênico, tensão cervical e atividade física excessiva podem ensejar uveítes e hifema, devendo ser evitados (Wilkie e Colitz, 2013).

A quantificação do *flare* fornece informações valiosas, relativamente à gravidade e intensidade da uveíte (Oshika et al., 1989). Em ambos os grupos, mostrou-se com intensidade maior comparativamente ao reportado por Krohne et al. (1998), no momento pré-operatório (M0) e elevou-se no pós-operatório imediato em decorrência da agressão mecânica induzida pela facoemulsificação (Jaffe, 1990; Sawa, 1990; Andrade, 2011; Conceição 2014).

Quantitativos de “flare” foram mais intensos no pós-operatório imediato em pacientes do Oc, já em Ot, esses valores mostraram-se mais intensos aos sete dias de pós-operatório, retornando a valores próximos aos basais, transcorridos 28 dias do procedimento cirúrgico (M4). Não houve diferença entre os grupos.

Relativamente aos momentos da avaliação, reporta-se que foram adotados visando a uma criteriosa monitoração dos eventos (Mencucci et al., 2006). Os momentos de avaliação possibilitaram que mudanças na celularidade endotelial fossem detectadas. O endotélio da córnea deve manter-se íntegro para que, ativamente, desidrate o estroma, mantendo-se assim a transparência corneal. Uma vez que a densidade das células endoteliais diminui a valores críticos, a descompensação endotelial decorrerá como consequência direta (Schwartzkopff et al, 2010), comprometendo a acuidade visual. Em 1976, Mccarey, Polack e Marshall reportaram que lesões em CECs estão associadas ao calor produzido por vibrações ultrassônicas, assim como aos danos mecânicos resultantes da presença de material nuclear na câmara anterior e à manipulação de instrumentais no espaço intraocular (Polack e Sugar, 1977). Tais eventos contribuem também para a formação de microbolhas e radicais livres (Topaz et al, 2002).

Pesquisa realizada em 42 cães, com idades variando entre 24 e 132 meses, portadores de catarata e submetidos à facoemulsificação, mostrou efeitos do procedimento cirúrgico sobre a densidade celular endotelial. Gwin et al (1983) encontraram perdas axiais da ordem de 22% (488 células/mm²), decorridos 30 dias das cirurgias. Tratam-se de resultados díspares aos percebidos em ambos os grupos concebidos nesta pesquisa, onde a perda celular aos 28 dias (M4), representou apenas 10,8% em Oc (244 células/mm²), e 9,1% (200 células/mm²). Similarmente, perdas na densidade celular de ambos os grupos foram inferiores às reportadas por Padua et al. (2017), onde as perdas celulares após 90 dias, alcançaram 25% (562 células/mm²) em seu grupo controle e 11,9% (251 células/mm²) no grupo tratado, onde adicionou-se 0,001M de ácido ascórbico estéril, diluído em 500mL de solução salina balanceada, como solução de irrigação na facoemulsificação. Na presente pesquisa, a avaliação temporal evidenciou tendências a perdas mais brandas, que, no entanto, mostraram-se mais vultuosas no Oc (11,7%; 266

células/mm²), após 90 dias de avaliação (M6), quando comparados a Ot (7,4%; 163 células/mm²). Estes dados representam perda endotelial 36,75% menor nos olhos que receberam Y-27632, quando comparados aos olhos controle aos 90 dias de pós-operatório.

Em contraste com as numerosas pesquisas realizadas em modelos animais, em que utilizaram indução experimental de lesões ao endotélio, para posterior avaliação do efeito de Y-27632 sobre essas células (Okumura et al., 2011; 2013; Miyagi et al., 2019), no presente estudo avaliou seu comportamento em pacientes cuja contagem inicial de CECs encontravam-se dentro dos valores normais para a espécie e idade. Desta forma, estudos complementares se fazem necessários para melhor elucidação dos efeitos dos inibidores de rho quinase sobre o endotélio corneal de cães com baixa contagem de CECs, mais susceptíveis à descompensação endotelial, na facoemulsificação.

Dados obtidos nas imagens à microscopia especular foram coletados e, então, corrigidos para se eliminarem possíveis erros na delimitação das células endoteliais e conseqüentemente, na leitura dos parâmetros pelo *software* (Cambas Andreu et al., 2014). Observaram-se erros grosseiros na delimitação celular e tendência a sobrestimar-se a contagem de células endoteliais quando o *software* fora utilizado em modo automático.

A reparação do endotélio corneal envolve aumento das células residuais, divisão nuclear, migração e a ocorrência do fenômeno de roseta, suscitando redução na densidade, aumento proporcional da área celular e alteração do padrão hexagonal (Mencucci et al., 2006). Gwin et al. (1983) mostraram diminuição da densidade celular e presença de pleomorfismo, e a ocorrência de lesões focais com áreas de degeneração celular bem marcadas, após facoemulsificação. Na presente pesquisa, evidências similares foram observadas em ambos os grupos, porém, sem diferença significativa entre os grupos ou momentos de avaliação.

Embora estudos farmacocinéticos ainda sejam necessários para determinar-se a persistência do Y-27632 no humor aquoso, admite-se que pela via de administração intracamerar, sua ação sobre o endotélio corneal seja

limitada a seu tempo de *turnover*. O volume médio de humor aquoso em cães é de 0,77mL (Gilger et al., 2005), e seu *turnover* de 5 μ l/min (Ward et al., 2001), sugerindo, desta forma, que a persistência do fármaco no humor aquoso é restrita a algumas horas. Em humanos, essa taxa é descrita entre 1,5 – 5 μ l/min (Bloom et al., 1976; Coakes e Brubaker, 1979). Cães possuem maior volume em câmara anterior quando comparados a camundongos, coelhos, primatas e humanos, o que pode resultar em maior diluição do fármaco, maior taxa de *clearance* e redução em sua eficácia (Thomasy et al., 2016b; Yang et al., 2019).

Aventa-se que a via de administração e, conseqüentemente, o tempo de ação do Y-27632 sobre as CEC avaliadas neste estudo tenham influência sobre sua capacidade de estimular a regeneração endotelial de forma mais evidente como relatado em estudos utilizando-se da via tópica (Okumura et al., 2016; Kinoshita et al., 2018; Miyagi et al., 2019). Estudo *ex-vivo* realizado por Achiron et al. (2018) sugere que a exposição profilática das células endoteliais humanas ao inibidor de ROCK Y-27632 durante sete dias prévios à facoemulsificação enseja diminuição significativa nas taxas de apoptose de CEC, reiterando que o momento da aplicação e tempo de exposição ao fármaco são fatores que influenciam a resposta celular.

7. Conclusões

Com base nos resultados obtidos e segundo as injunções do meio em que a pesquisa fora concebida, admite-se que:

A aplicação intracameral de 0,3mL contendo 100 μ mol/L de Y-27632 durante o procedimento de facoemulsificação em cães em condições normais, colabora para a estabilidade das células do endotélio corneal, diminuindo sua perda em comparação com sua não utilização.

A aplicação do Y-27632 pela via intracameral constitui protocolo seguro e viável para experimentação, não causando alterações indesejáveis às estruturas oculares em cães.

8. Referências

Abib FC, Barreto J (2001) Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**. 27: 1574-1578.

Anderson SC, Stone C, Trach L, Sundarraj N (2002) Rho and Rho-kinase (ROCK) signaling in adherens and gap junction assembly in corneal epithelium. **Investigative Ophthalmology Vision Sciences**. 43:978-986.

Achiron A, Feldman A, Karmona L, Avizemer H, Barequet IS, Rosner M, Vishnevskia-Dai V (2018). Prophylactic exposure of human corneal endothelial cells to Rho-associated kinase inhibitor reduced apoptosis rate after phacoemulsification: Ex vivo study. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, 44:1261-1266.

Andrade AL, Conceição LF, Morales A, Padua IRM, Guimaraes PJ, Sakamoto SS, Souza E, Laus JL. (2011) Microscopia especular de não contato e flarefotometria à laser no pré e pós-operatórios imediatos de cães submetidos à facoemulsificação pela técnica v-prechop. CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA. **Resumos...** Goiânia.

Andrade AL, Ribeiro AP, Padua IRM, Renzo R, Laus JL (2010) Microscopia especular de não contato do endotélio corneal em cães jovens e adultos. PANVET - CONGRESSO PANAMERICANO DE MEDICINA VETERINÁRIA, **Resumos...**Peru.

Andrew SE, Willis AM, Anderson DE (2002) Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llama and alpacas. **American Journal of Veterinary Research**. 63: 326-329.

Arshinoff SA (1999) Dispersive-cohesive viscoelastic soft shell technique. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, 25: 167-173.

Arshinoff SA (2000) New terminology: Ophthalmic viscosurgical devices. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, 26:627-628.

Aznar S, Valeron-Fernandes P, Espina C, Lascal JC (2004) Rho GTPases: potencial candidates for anticancer therapy. **Cancer Letter**. 206:181-191.

Barnett KC, Startup FG (1985) Hereditary cataract in the standard poodle. **Veterinary Record**. 117:15-16.

____.(1988) Inherited eye disease in the dog and cat. **Journal Small Animal Practice**. 29:462-75.

Barros JN, Mascaro VLDM, Gomes JAP, Freitas D, Lima ALH (2001) Citologia de impressão da superfície ocular: técnica de exame e de coloração. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. 64:127-131, 2001.

Barros PSM, Angelotti AC, Nobre F, Morales, A, Fantoni, DT, Barros, SBM (1999) Antioxidant profile of cataractous English Cocker Spaniels. **Veterinary Ophthalmology**. 2: 83–86.

Bernays ME, Peiffer RL (2000) Morphologic alterations in the anterior lens capsule of canine eyes with cataracts. **American Journal of Veterinary Research**, 61:1517-1519.

Biaggi CP, Barros PSM, Silva VV, Brooks DE, Barros SBM (2006) Ascorbic acid levels of aqueous humor of dog after experimental phacoemulsification. **Veterinary Ophthalmology**, 9:299-302.

Biros DJ, Gelatt KN, Brooks DE, Kubilis PS, Andrew SE, Strubbe DT, Whigham HM (2000). Development of glaucoma after cataract surgery in dogs: 220 cases (1987–1998). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 216:1780-1786.

Bistner SI (1992) Recent developments in comparative ophthalmology. **Compendium on Continuing Education Practicing Veterinarian**. 14:1304-23.

Bloom JN, Levene RZ, Thomas G, Kimura R (1976). Fluorophotometry and the rate of aqueous flow in man: I. Instrumentation and normal values. **Archives of Ophthalmology**, 94:435-443.

Boettner B, Aelst, VL (2002) The role of Rho GTPases in disease development. **Gene**, 286:155-184.

Boscia F, Grattagliano I, Vendemiale G, Micelli-Ferrari T, Altomare E (2000) Protein oxidation and lens opacity in humans. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. 41:2461–2465.

Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO (1997) Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. 38:779-782

Bras, ID, Colitz, CMH, Saville, WJA., Gemensky-Metzler, AJ, Wilkie, DA (2006). Posterior capsular opacification in diabetic and nondiabetic canine patients following cataract surgery. **Veterinary Ophthalmology**, 9: 317-327.

Buratto L, Zanini M, Savini G. Techniques of phacoemulsification. (2003) In: **Phacoemulsification Principles and Techniques**, 2a ed. Slack Incorporated, Thorofare, 97– 158.

Cambas Andreu A, Guerra Almaguer M, de Prada Sánchez C, Delgado Castillo O, García López de Trigo G. (2014). Microscopia especular con corrección manual vs. software automatizado. **Revista Cubana de Oftalmología**, 27:359-368.

Cameron MD, Poyer JF, Aust SD (2001) Identification of free radicals produced during phacoemulsification. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**. 27:463-470.

Chan T, Payor S, Holden BA (1983) Corneal thickness profiles in rabbits using an ultrasonic pachimeter. **Investigative ophthalmology and Visual Sciences**, 24:1408-1410.

Chandler HL, Webb TR, Barden CA, Thangavelu M, Kulp SK, Chen CS, Colitz CMH. (2010) The effect of phosphorylated Akt inhibition on posterior capsule opacification in an ex vivo canine model. **Molecular Vision**, 16: 2202-2214, 2010.

Chandler HL, Barden CA, Kusewitt DF, Colitz CMH (2005) Markers of epithelial-mesenchymal transition during canine cataractogenesis. **Veterinary Ophthalmology**. 8:440

Coakes RL, Brubaker RF (1979). Method of measuring aqueous humor flow and corneal endothelial permeability using a fluorophotometry nomogram. **Investigative ophthalmology & visual science**. 18: 288-302.

Conceição, LF. (2014) **ocorrência de opacidade de cápsula posterior em cães pós-facoemulsificação, com ou sem a utilização de lente intraocular dobrável e efeitos do ND:YAG laser**. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal.

Croix NL (2008) Cataracts: When to refer. **Topics in companion animal medicine**. 23: 46-50.

Davidson MG, Nasisse MP, Jamieson VE, English RV, Oliveira DK (1991) Phacoemulsification and intraocular lens implantation: a study of surgical results in 182 dogs. **Progress in veterinary and comparative ophthalmology**. 1:233-8.

Davidson MG, Nelms SR (2007) Diseases of the canine lens and cataract formation. In: Gellat KN, **Veterinary ophthalmology**, 4ed. Oxford: Blackwell Publications, p.859-887.

Dziezyc J (1990) Cataract surgery. Current approaches. **Veterinary clinics of north america small animal practice**. 20:737-54.

Fischer CA (1989) Geriatric Ophthalmology. **Veterinary clinics of north america small animal practice**. 19:103-23.

Gelatt KN (2007) **Veterinary Ophthalmology**. 2.ed. Philadelphia:Lea & Febiger, 1671p.

Gilger BC, Whitley DR, McLaughlin SA, Wright JC, Boosinger TR (1993) Clinicopathologic findings after experimental implantation of synthetic

intraocular lenses in dogs. **American Journal Veterinary Research.** 54:616-621.

Glover TD, Constantinescu GM (1997) Surgery for cataract. **Veterinary clinics of north america small animal practice.** 27:1143-73.

Goldin JR (1995) **Pesquisa em saúde e direitos dos animais.** Porto Alegre: HCPA, 28p.

Gum GG, Gelatt KN, Ofri R (1999) Physiology of the eye. In: GELATT, KN **Veterinary ophthalmology.** 3.ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.151-182.

Gwin RM, Lerner I, Warren KJ (1982) Decrease in canine corneal endothelial cell as functions of age. **Investigative Ophthalmology and Visual Science.** 22: 267–271.

Gwin RM, Warren KJ, Samuelson AD, Gum GG (1983) Effects of phacoemulsification and extracapsular lens removal on cornea thickness and endothelial cell density in the dog. **Investigative Ophthalmology and Visual Science.** 24:227-236.

Hayashi K, Hayashi H, Nakao F, Hayashi F (1996) Risk factors for corneal endothelial injury during phacoemulsification. **Journal of Cataract and Refractive Surgery.** 22:1079–1084.

Hejny C, Edelhauser HF. Surgical pharmacology: intraocular solutions and drugs used for cataract surgery. In: Buratto, L, Werner, L, Zanini, M, Apple, D. **Phacoemulsification Principles and Techniques.** 2 ed. 12:219.

Holst A, Rolfsen W, Svensson B, Ollinger K, Lundgren B (1993) Formation of free radicals during phacoemulsification. **Current Eye Research.** 12:359–365.

Honsho CS, Oriá AP, Pigatto JAT, Laus JL. (2007) Modified extracapsular extraction versus endocapsular phacoemulsification: intraoperative and immediate postoperative events. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia,** 59:105-113.

Hull DS (1990) Oxygen free radicals and corneal endothelium.

Transactions of the american ophthalmological society. 88:463–511.

Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, Narumiya S (2000) Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated kinases. **Molecular Pharmacology.** 57:976-983.

Jaffe NS, Jaffe MS, Jaffe GF. (1990) **Cataracts surgery and its complications.** 5. Ed. 400-411.

Johnson BC, Miller WW (1990) Recognizing ocular signs of systemic diseases in dogs. **Veterinary medicine.** 85:1076-90.

Johnstone N, Ward DA (2005) The incidence of posterior capsule disruption during phacoemulsification and associated postoperative complication rates in dogs: 244 eyes (1995-2002). **Veterinary ophthalmology.** 8: 47-50.

Jung CH, Han JO, Kyung YC (2013) Long-term results after cataract surgery in patients with low corneal endothelial cell density. **Journal korean ophthalmological.** 54: 602-609.

Kara Jr. N. Substâncias viscoelásticas mantendo espaços e protegendo estruturas. In.: Arieta, CEL. (2002) **Cristalino e catarata.** Rio de Janeiro: Cultura Médica, 103-114.

Kern TJ. (1990) Ulcerative keratitis. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice,** 20:645-666.

Kim SY, Kim JH, Choi JS, Joo CK. (2008) Comparison of posterior capsule opacification in rabbits receiving either mitomycin-C or distilled water or sealedcapsule irrigation during cataract surgery. **Clinical and Experimental Ophthalmology.** 35: 755-758.

Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Science.** 273:245-248.

Kinoshita S, Koizumi N, Ueno M, Okumura N, Imai K, Tanak, H, Toda M. (2018). Injection of cultured cells with a ROCK inhibitor for bullous keratopathy. **New England Journal of Medicine**, 378:995-1003.

Klein HE, Krohne SG, MooreGE, Stiles J (2011). Postoperative complications and visual outcomes of phacoemulsification in 103 dogs (179 eyes): 2006–2008. **Veterinary ophthalmology**, 14: 114-120.

Krohne SG, Blair MJ, Bingaman D, Gionfriddo, JR. (1998) Carprofen inhibition of flare in the dog measured by laser flare photometry. **Veterinary Ophthalmology**. 1:81-84.

Leung T, Manser E, Tan L, Lim L (1995) A novel serine/threonine kinase binding the ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. **The Journal of Biological Chemistry**. 270:29051-29054.

Liao, JK., Seto, M, Noma (2007) Rho kinase (ROCK) inhibitors. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. 50:17-24.

Malliri A, Rygiel TP, Van Der Kammen RA, Song JY, Engers R, Hurlstone AF, Clevers H, Collard JG (2006) The rac activator Tiam1 is a Wnt-responsive gene that modifies intestinal tumor development. **The Journal of Biological Chemistry**. 281:543-548.

Martins BC, Ribeiro A, Ortiz JPD. (2011) Ultrasonographic analysis of senile cataractous lens of dogs and its correlation to phacoemulsification. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 63: 1104– 1112.

Martins BC (2008) **Características ecográficas da lente cataratogênica senil em cães (Canis – familiaris LINNAEUS, 1758) e a sua correlação com parâmetros de facoemulsificação**. 51 f. (Tese de Doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

Maurice, DM. (1970) The transparency of the corneal stroma. **Vision Research**.10:107-108.

McCarey BE, Pollack FM, Marshall W (1976) The phacoemulsification procedure: The effect of intraocular irrigating solutions on the corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. 15: 449–457.

Mencucci, R, Ponchietti, C, Virgili, G, Giansanti, F, Menchini, U (2006) Corneal endothelial damage after cataract surgery: Microincision versus standard technique. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**. 32:1351-1354.

Miyagi H (2019) Topical Rho-Associated Kinase Inhibitor, Y27632, Accelerates Corneal Endothelial Regeneration in a Canine Cryoinjury Model. **Cornea**, 38: 352–359.

Moore RD, McLellan JG, Dubielzig R (2003) A study of the morphology of canine eyes enucleated or eviscerated due to complications following phacoemulsification. **veterinary ophthalmology**. 6:219-226.

Mueller BK, Mack H, Teusch N (2005) Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**. 4:387-398.

Munger RJ (2009) Catarata. In.: Laus, JL. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e gatos**. 1a. Ed. São Paulo: Roca p.116-32.

Nasisse MP, Davidson MG, Jamieson VE (1991) Phacoemulsification and intraocular lens implantation: a study of technique in 182 dogs. **Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology** 1: 225–232.

Nemet AY, Assia EI, Meyerstein D, Meyerstein N, Gedanken A, Topaz, M (2007) Protective effect of free-radical scavengers on corneal endothelial damage in phacoemulsification. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**. 33:310-315.

Nomanbhoy KT, Cerione RA (1996) Characterization of the interaction between RhoGDI and Cdc42Hs using fluorescence Spectroscopy. **The Journal of Biological Chemistry**. 271:10004-10009.

Okumura N, Koizumi N, Kay PE, Ueno M, Sakamoto Y, Nakamura S, Hamuro J, Kinoshita (2013) The rock inhibitor eye drop accelerates corneal endothelium wound healing. **Investigative ophthalmology and visual science**. 54: 2439-2502.

Okumura, N, Koizumi, N, Ueno, M, Sakamoto, Y, Takahashi, H, Hirata, K, Torii, R, Hamuro, J, Kinoshita, S (2011) Enhancement of corneal endothelium wound healing by rho-associated kinase (rock) inhibitor eye drops. **British journal of ophthalmology**. 95:1006-1009.

Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Tsuchiya H, Hamuro J, Kinoshita S (2012) ROCK inhibitor converts corneal endothelial cells into a phenotype capable of regenerating in vivo endothelial tissue. **The American Journal of Pathology**. 181- 268-277.

Okumura N, Ueno M, Koizumi N, Sakamoto Y, Hirata K, Hamuro J, Kinoshita S (2009) Enhancement on primate corneal endothelial cell survival in vitro by a rock inhibitor. **Investigative Ophthalmology And Visual Science**. 50: 3680-3687.

Olson MF (2008) Applications for ROCK kinase inhibition. **Current Opinion in Cell Biology**. 20:242-248.

Özgencil FE (2005) The results of phacofragmentation and aspiration surgery for cataract extraction in dogs. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**. 29:165 – 173.

Pacifico RL (1994) Ultrasonic energy in phacoemulsification: mechanical cutting and cavitation. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**. 20: 338–341.

Padua IRM, Valdetaro G, Lima T, Kobashigawa K, Silva P, Aldrovani M, Padua PP, Laus JL (2017) Effects of intracameral ascorbic acid on the corneal endothelium of dogs undergoing phacoemulsification. **Veterinary Ophthalmology**, 20:1–9.

Pigatto JAT, Abib FC, Pereira GT (2006) Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 43: 476–480.

Pigatto JAT, Cerva C, Freire CD, Abib FC, Bellini LP, Barros PSM, Laus, JL (2008) Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 28: 427-430.

Polack FM, Sugar A. (1976) The phacoemulsification procedure. Part II. Corneal endothelial changes. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. 15: 458–469.

Rodrigues GN, Laus JL, Santos JM (2006) Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. **Veterinary Ophthalmology**. 9: 101–107.

Rubowitz A, Assia IE, Rosner M (2003) Antioxidant protection against corneal damage by free radicals during phacoemulsification. **Investigative ophthalmology and visual Science**. 44: 1866–1870.

Samarin, SN, Ivanov, AI, Flatau, G, Parkos, CA, Nusrat, A (2007) Rho/Rho-associated kinase-II signaling mediates disassembly of epithelial apical junctions. **Molecular Biology of the Cell**. 18:3429-3439.

Sawa M. Clinical application of laser flare-cell meter. *Japanese Journal of Ophthalmology*. 34:346-363, 1990.

Schwartzkopff J, Bredow, L, Mahlenbrey, S, Boehringer, D, Reinhard, T (2010) Regeneration of corneal endothelium following complete endothelial cell loss in rat keratoplasty. **Molecular Vision**. 16: 2368-2375.

Shibuya M, Hirai S, Seto M, Satoh S., Ohtomo E (2005) Effects of fasudil in acute ischemic stroke: results of a prospective placebo controlled double-blind trial. **Journal of the Neurological Sciences**. 238:31-39.

Sies H (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American journal of medicine**, v:31-38.

Sigle KJ, Nasisse MP (2006) Long-term complications after phacoemulsification for cataract removal in dogs: 172 cases (1995-2002). **Journal American Veterinary Medical Association**. 228: 74-79.

Slatter D (2005) **Fundamentos de Oftalmologia Veterinaria**, 3ª ed. Roca, Sao Paulo.

Steinert RF (1995) Corneal edema after cataract surgery. *Steinert RF. Cataract surgery*. Saunders, Philadelphia, 30:358-63.

Takahashi H, Sakamoto A, Takahashi R, Ohmura T, Simmura S, Ohara K (2002) Free radicals in phacoemulsification and aspiration procedures. **Archives of Ophthalmology**. 120:1348–1352.

Takahashi H, Sakamoto A, Takahashi R (2002) Free radicals in phacoemulsification and aspiration procedures. **Archives of Ophthalmology**. 120: 1348–1352.

Teixeira AL (2003) **Estudo comparativo do estresse oxidativo após facoemulsificação experimental com e sem implante de lentes intraoculares em cães**. São Paulo: FMVZ-USP. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – 50 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 134p.

Teixeira AL, Barros LFM, Barros PSM (2009) Afecções da Túnica Vasculár. In: LAUS, J.L. **Oftalmologia Clínica e Cirúrgica em Cães e em Gatos**. cap. 5, 1ª ed., ed. Roca, São Paulo.

Thomasy SM, Cortes DE, Hoehn AL, Calderon AC, Li JY, Murphy CJ (2016a). In vivo imaging of corneal endothelial dystrophy in Boston Terriers: a spontaneous, canine model for Fuchs' endothelial corneal dystrophy. **Investigative ophthalmology & visual science**. 57:495-503.

Thomasy SM, Eaton JS, Timberlake MJ, Miller PE, Matsumoto, S, Murphy, CJ (2016b). Species differences in the geometry of the anterior segment differentially affect anterior chamber cell scoring systems in laboratory animals. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**. 32(1), 28-37.

Topaz M, Motei M, Assia E (2002) Acoustic cavitation in phacoemulsification: chemical effects, modes of action and cavitation index. **Ultrasound in Medicine and Biology**. 28: 775–784.

Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature**. 389:990.

Varma SD, Srivastava VK, Richards RD (1982) Photoperoxidation in lens and cataract formation: preventive role of superoxide dismutase, catalase and vitamin C. **Ophthalmic Research**. 14:167-175.

Varma, SD (1991) Scientific basis for medical therapy of cataracts by antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**. 53:335-345.

Vega, MF, Ridley, JA (2008) Rho GTPases in cancer cell biology. **FEBS Letters**. 582: 2093-2101.

Walsh, SV, Hopkins, AM, Chen, J, Narumiya, S, Parkos, CA, Nusrat, A (2001) Rho kinase regulate tight junction function and is necessary for tight junction assembly in polarized intestinal epithelia. **Gastroenterology**. 121:566-579.

Waring, GO (1984) Corneal structure and pathophysiology. In: Leibowitz, HWB. Corneal disorders: clinical diagnosis and management. Philadelphia: W. B. Saunders, 3-25.

Werblin, TP (1993) Long-term endothelial cell loss following phacoemulsification: model for evaluating endothelial damage after intraocular surgery. **Refractive Corneal Surgery**. 9:29–35.

Whitley, RD, McLaughlin, SA, Whitley, EM, Gilber, BC (1993a) Cataract removal in dogs: The presurgical considerations. **Veterinary Medicine**. 88:848-58.

_____. (1993b) Cataract removal in dogs: The surgical techniques. **Veterinary Medicine**. 88:859-66.

Wilkie DA, Colitz CMH (2007) Surgery of the canine lens. In: Gelatt KN. **Veterinary Ophthalmology**. 4ed. Oxford: Blackwell Publishing, 1672p.

Wilkie DA, Colitz CMH (2013) Surgery of the canine lens. In: Gelatt KN, Gilger BC, Kern TJ. **Veterinary Ophthalmology**. 5ed. Oxford: Blackwell Publishing. 2170p.

Williams, DL, Boydell, IP, Long, RD (1996) 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**.138: 347-53.

Williams, DL, Munday, P (2006) The effect of a topical antioxidant formulation including N-acetyl-carnosine on canine cataract: preliminary study. **Veterinary Ophthalmology**, 9:311-316.

Yang VY, Miller PE, Keys DA, La Croix NC (2019). Effects of 0.02% netarsudil ophthalmic solution on intraocular pressure of normotensive dogs. **Veterinary Ophthalmology**.00:1-9.

Yee, RW, Edelhauser, HF, Stern, ME (1987) Specular microscopy of vertebrae corneal endothelium: a comparative study. **Experimental Eye Research**. 44:703-714.

Yee, RW, Matsuda, M, Schultz, RO, Edelhauser, HF (1985) Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. **Current Eye Research**, 4:671-678.