

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA CÁPSULA
POSTERIOR ASSOCIADA AO IMPLANTE DE
LENTE INTRAOCULAR COM SUPERFÍCIE
MODIFICADA. ESTUDO EXPERIMENTAL EM
COELHOS**

Vivian Lima de Souza

Botucatu-SP

Julho / 2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA CÁPSULA
POSTERIOR ASSOCIADA AO IMPLANTE DE LENTE
INTRAOCULAR COM SUPERFÍCIE MODIFICADA. ESTUDO
EXPERIMENTAL EM COELHOS**

Vivian Lima de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- UNESP- Campus de Botucatu para obtenção do título de Mestre.

Orientadora Professora Adjunta Cláudia Valéria Seullner Brandão

Título: Avaliação histopatológica da cápsula posterior associada ao implante de lente intraocular com superfície modificada. Estudo experimental em coelhos
Autora: Vivian Lima de Souza

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Cláudia Valéria Seullner Brandão

Presidente e Orientadora

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. José Joaquim Tilton Ranzani

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Adj. Cláudia Helena Pellizzon

Membro

Departamento de Morfologia

IBB – UNESP – Botucatu

Data da defesa: 07 de julho de 2014

Dedicatória

*Aos meus queridos pais Teresinha e Leopoldo,
à minha irmã Verônica, sobrinha Cecília e ao meu cão Simba.*

Agradecimientos

À minha orientadora e amiga, Cláudia Valéria Seullner Brandão, que está comigo desde a graduação, orientando nas escolhas dos meus estágios, durante a residência lapidando o meu amor pela cirurgia. Agradeço, neste momento, pela oportunidade do mestrado. Muito obrigada pela paciência, disponibilidade, orientação, por todo carinho e amizade.

À minha coorientadora, Cláudia Helena Pellizon, agradeço por toda orientação na realização e na análise das lâminas de histologia e imunohistoquímica. Agradeço pela paciência e toda ajuda na definição dos cortes das lentes, bem como na definição dos imunomarcadores, protocolos e execução dos mesmo. Muito obrigada pela disponibilidade de tempo.

Ao docente e amigo, José Joaquim Tilton Ranzani, agradeço por todo auxílio, incentivo profissional e pessoal, e pelo imenso carinho que sempre demonstrou ter por mim.

À Maria Guadalupe Sereno, pela oportunidade de dar continuidade a um trabalho tão bem e arduamente executado, por ter estado sempre disposta a ajudar e principalmente por passar sem exitar, seu conhecimento sobre a oftalmologia veterinária desde minha fase de estagiária até o presente momento.

À Cristiane de Abreu Estanislau, agradeço por ter dividido comigo, desde a residência, momentos maravilhosos, de uma grande e verdadeira amizade, e acho que foi realmente isso que contruímos ao longo destes anos. Obrigada por todo apoio nos momentos mais difíceis, e principalmente por estar sempre por perto, disposta a me ajudar, a aconselhar, a me ouvir. Muito obrigada por toda paciência, por todo carinho e amor.

À Natália Rodrigues Rodas, agradeço por sua amizade e confiança. Dividimos medos, inseguranças e fragilidades uma com a outra, e acho que de certa forma crescemos juntas como seres humanos e como profissionais. Obrigada por cada conversa que tivemos, por cada ajuda que me deu, e foram tantas. Obrigada por

ter confiado em mim, e mais ainda, por ter aceitado esta nova amiga que a vida te apresentava, e você aceitou da forma mais bela e carinhosa.

À Thaísa Candido, que conheço desde a graduação, mas que durante a residência e posteriormente no mestrado, tornou-se uma amiga confidente, alguém com quem dividi por muitas horas de conversa as minhas inseguranças, dúvidas e dividiu comigo as suas, alguém que desejo ter sempre por perto em minha vida. Obrigada por sua presença nos momentos difíceis, tornando-os mais agradáveis, e nos momentos alegres, tornando-os maravilhosos.

Ao Felipe Zanuzzo, agradeço pelos anos que passamos juntos durante a residência, pelos casos que dividimos, pelas anestésias realizadas por você, que me proporcionaram ótimas cirurgias. Agradeço por confiar em mim quando me convidou a participar do seu projeto, foram madrugadas de muito trabalho, mas de grande alegria e crescimento profissional. Obrigada ainda e especialmente, pela sua presença na cirurgia que seria pra mim a mais difícil, não como cirurgião, mas como proprietária. Obrigada por ter tornado aquele momento menos doloroso.

À Natalie Bertelis Merlini, Cíntia Sesso Perches, Joice Fonzar, Luciana Pardini Úrsula Guberman, Rodrigo Barros agradeço por cada dia que passamos juntos ao longo destes anos, discutindo casos, dividindo experiências e conhecimentos, sejam estes sobre oftalmologia ou não. Muito Obrigada por terem tornado essa jornada algo inesquecível, por terem contribuído na minha evolução profissional, e principalmente na minha evolução pessoal que esta sim é a mais importante. A finalização deste projeto, eu devo certamente a toda “equipe e família oftalmo”.

Às minhas amigas, Priscila Coelho, Mayana Valinhos, Simone Koo, Viviam Rocco, Tais Donato, Vanessa Feijó e Lilian Vieira agradeço pelo amor, apoio, conselhos e momentos de descontração. Obrigada por tantos anos de amizade verdadeira, que nem mesmo a mais longa distância foi capaz de reduzir o amor existente. Obrigada por tornarem menos árdua e mais alegre, a minha trajetória nesta vida.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovan, agradeço pela contribuição na análise estatística dos resultados.

Aos residentes do serviço de Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais pelo encaminhamentos dos casos e aos residentes e pós graduandos do serviço de Anestesiologia, agradeço pelas cirurgias da rotina oftálmica, que contribuíram para a minha evolução profissional.

Aos funcionários da UNIPEX, Marta Regina Russo Sarzi e Florian Fontana, agradeço por toda ajuda e paciência na realização das lâminas de histologia e imunohistoquímica. A finalização deste projeto só foi possível devido ao excelente trabalho que vocês realizam.

À equipe do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – FMVZ/UNESP, Maria Aparecida Dias de Almeida Manoel e Carlos Pazini Junior, e em especial ao José Roberto de Lalla Júnior, que hoje faz parte da Diretoria de Divisão Técnica Acadêmica, agradeço pelo auxílio e pelos esclarecimentos das dúvidas ao longo desses anos.

À professora Renée Laufer Amorim e ao pós graduando Carlos Eduardo Fonseca, por terem disponibilizado o marcador Vimentina, contribuindo assim para a execução e finalização deste experimento.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – FMVZ/UNESP, agradeço pela disponibilização dos recursos necessários à essa pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), agradeço pela Bolsa de Estudos concedida, que proporcionou a realização deste estudo e a minha permanência e exclusividade no programa de pósgraduação.

Epígrafe

*“Quem não compreende um olhar,
tampouco compreenderá uma longa explicação.”*

Mario Quintana

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
Quadro 1. Anticorpos monoclonais e titulação utilizados	34
Quadro 2. Anticorpos monoclonais e titulação utilizados	34
Tabela 1. Mediana, valores mínimo e máximo dos escores celularidade na cápsula posterior segundo grupo e momentos de avaliação em semanas	43
Tabela 2. Mediana, valores mínimo e máximo da variável espessura média da cápsula posterior (espessura CP) em μm , segundo grupo e momentos de avaliação em semanas	44
Tabela 3. Mediana, valores mínimo e máximo da variável enrugamento da cápsula posterior segundo grupo e momentos de avaliação em semanas	47
Tabela 4. Mediana, valores mínimo e máximo da variável distância média entre cápsulas anterior e posterior (distância AP) em μm , segundo grupo e momentos de avaliação em semanas	51
Tabela 5. Mediana, valores mínimo e máximo da variável espessura média da cápsula anterior (espessura CA) em μm , segundo grupo e momentos de avaliação em semanas	51
Tabela 6. Mediana, valores mínimo e máximo da variável quantidade de células imunomarcadas com alfa-actina, segundo grupo e momentos (M) de avaliação em semanas	54
Tabela 7. Distribuição numérica e percentual (%) da imunomarcção alfa-actina segundo grupo e momentos de avaliação em semanas	55
Tabela 8. Mediana, valores mínimo e máximo da variável quantidade de células imunomarcadas com Ki67 na cápsula posterior, segundo grupo e momentos de avaliação em semanas.....	58
Tabela 9. Distribuição numérica e percentual (%) da imunomarcção Ki67 na cápsula posterior segundo grupo e momentos de avaliação em semanas	59

Tabela 10.	Mediana, valores mínimo e máximo da variável quantidade de células imunomarcadas com vimentina, na cápsula posterior, segundo grupo e momentos de avaliação em semanas	60
Tabela 11.	Distribuição numérica e percentual (%) da marcação de vimentina segundo grupo e momentos de avaliação em semanas	61

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Imagem fotográfica do bulbo ocular sendo incisado na esclera	31
Figura 2. Imagem fotográfica do bulbo ocular do coelho do GL	31
Figura 3. Imagem fotográfica do bulbo ocular do GL, após sua completa remoção	32
Figura 4. Imagem fotográfica do saco capsular do GPEG	36
Figura 5. Imagem fotográfica do saco capsular de um coelho do GC ..	37
Figura 6. Imagem fotográfica da lente do GF	37
Figura 7. Fotomicrografia de corte histológico da cápsula anterior do GC no M24 (HE, 40x)	39
Figura 8. Fotomicrografia de corte histológico da região equatorial do GC no M24 (HE, 40x)	39
Figura 9. Fotomicrografia de corte histológico da cápsula posterior do GC no M24 (HE, 40x)	40
Figura10. Fotomicrografia de corte histológico da cápsula posterior do GPEG no M12 (HE, 40x)	40
Figura 11. Fotomicrografia de corte histológico da cápsula posterior do GF no M24 (HE, 40x)	41
Figura 12. Fotomicrografia de corte histológico do GPEG no M24 (HE, 40x)	48
Figura 13. Fotomicrografia de corte histológico do GC no M24 (HE, 40x)	48
Figura 14. Fotomicrografia de corte histológico GF (HE, 40x)	50
Figura 15. Fotomicrografia de corte histológico do GPEG (HE, 40x)	50
Figura 16. Imunomarcção para alfa-actina na cápsula posterior do GPEG	53
Figura 17. Imunomarcção para alfa-actina na cápsula posterior GC ..	54
Figura 18. Imunomarcção para Ki67 na cápsula posterior do GPEG ..	56

Figura 19.	Imunomarcaco para Ki67 na região equatorial do GPEG ...	57
Figura 20.	Imunomarcaco para Ki67 na cápsula anterior do GPEG	58
Figura 21.	Imunomarcaco para vimentina nas cápsula posterior do GC	59
Figura 22.	Imunomarcaco para vimentina na cápsula anterior (CA), região equatorial e cápsula posterior (CP) do GL	60

LISTA DE ABREVIATURAS

CA	Cápsula anterior
CELS	Células epiteliais da lente
CELS A	Células epiteliais do tipo A
CELS E	Células epiteliais do tpo E
CP	Cápsula posterior
Fls	Filamentos intermediários
g/mol	gramas por mol
GC	Grupo controle
GF	Grupo plasma de Flúor
GL	Grupo lente comercial
GPEG	Grupo plasma de polietilenoglicol
HE	Hematoxilina e eosina
IM	Intramuscular
kg	Quilograma
LIO	Lente intraocular
M	Momento de avaliação
M12	12 semanas
M24	24 semanas
mg/Kg	miligrama por quilo
mL/Kg	mililitro por quilograma
mm	milímetro
n	número de amostras
OCA	Opacidade de cápsula anterior
OCP	Opacidade de cápsula posterior
PEG	Polietilenoglicol
PMMA	Polimetilmetacrilato
%	por cento
µm	micrometro

SOUZA, V.L. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA CÁPSULA POSTERIOR ASSOCIADA AO IMPLANTE DE LENTE INTRAOCULAR COM SUPERFÍCIE MODIFICADA. ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS. Botucatu/SP, 2014, 97p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A opacidade de cápsula posterior (OCP) é a complicação tardia mais comum após a remoção da catarata. Caracteriza-se pelo desenvolvimento de uma nova barreira à passagem da luz, principalmente quando localizada no eixo óptico, promovendo perda gradativa da visão. Várias técnicas foram desenvolvidas com o intuito de se evitar a OCP. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento da superfície de LIOs acrílicas utilizando-se plasma de Flúor ou polietilenoglicol (PEG) na prevenção da OCP. Foram utilizados 40 olhos de coelhos, submetidos à cirurgia de facoemulsificação, e distribuídos em quatro grupos experimentais (n=10), sendo, grupo Controle (CG), coelhos sem implante de LIO; grupo com LIO tratada com plasma de polietilenoglicol (GPEG), grupo com LIO tratada com plasma de Flúor (GF), e grupo com LIO comercial (GL). As cápsulas posteriores das lentes dos grupos foram avaliadas por meio de análise histopatológica, incluindo morfometria e imunohistoquímica. Os grupos GPEG e GL apresentaram menor espessura da cápsula posterior na avaliação inicial (12 semanas) em relação ao controle. No período final de avaliação (seis meses), os tratamentos da superfície da LIO à base de plasma de flúor e polietilenoglicol não reduziram o desenvolvimento das alterações histológicas associadas à opacidade de cápsula posterior. O tratamento das superfícies das lentes intraoculares com plasma de flúor e polietilenoglicol pode ser realizado como adjuvante na prevenção da opacidade de cápsula posterior, pois não causa alterações na morfologia da lente após facoemulsificação.

Palavras-chave: plasma, Flúor, polietilenoglicol, OCP, morfometria, imunohistoquímica.

SOUZA, V.L. EVALUATION HISTOPATHOLOGICAL OF POSTERIOR CAPSULE ASSOCIATED WITH INTRAOCULAR LENS IMPLANT WITH SURFACE MODIFIED. EXPERIMENTAL STUDY IN RABBITS. Botucatu / SP, 2014, 97p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The posterior capsule opacification (PCO) is the most common late complication after cataract removal. It is characterized by the development of a new barrier to the passage of light, especially when located on the optical axis, promoting gradual loss of vision. Various techniques have been developed with the aim of preventing PCO. The objective of this study was to evaluate the effect of surface treatment of acrylic IOLs using Fluorine plasma or polyethylene glycol (PEG) in prevent for PCO. Forty rabbit eyes that underwent phacoemulsification were used and distributed into four experimental groups (n = 10): Control group (CG), rabbits without IOL implantation; IOL group treated with polyethylene glycol plasma (GPEG), IOL group treated with fluoride plasma (GF), and commercial IOL group (GL). The posterior capsule of the lens were evaluated by histopathological analysis, including morphometric and immunohistochemical studies. The GPEG and GL groups presented thinner posterior capsule at initial assessment (12 weeks) compared to control group. At the end of evaluation (six months), the treatment of IOL surface with fluorine and polyethylene glycol plasma did not reduce the development of histological changes associated with posterior capsule opacification. The surface treatment of IOLs with Fluoride and polyethylene glycol can be performed as an adjuvant in prevention PCO, because it does not cause changes in the morphology of lens after phacoemulsification surgery

Key words: plasma, Fluorine, polyethylene glycol, PCO, morphometry, immunohistochemistry.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS e TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Catarata	5
2.2 Opacidade de cápsula posterior	8
2.2.1 Causas e Incidências	10
2.2.2 Avaliação clínica e histológica	12
2.2.3 Tratamento	14
2.2.4 Prevenção	14
2.3 Opacidade de cápsula anterior e interlenticular	20
2.4 Imunohistoquímica	21
2.4.1 Alfa-actina	21
2.4.2 Ki67	22
2.4.3 Vimentina	23
3. OBJETIVOS	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Animais	28
4.2 Aspectos éticos	28
4.3 Grupos experimentais	28
4.4 Procedimentos anestésicos e cirúrgicos	29
4.5 Momentos de avaliação	29
4.6 Avaliação macroscópica e histopatológica	30
4.7 Avaliação histomorfométrica	32
4.8 Avaliação imunohistoquímica	33

4.9	Análise estatística	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Avaliação macroscópica	36
5.2	Análise histomorfométrica	37
5.3	Imunohistoquímica	52
5.3.1	Alfa-actina	52
5.3.2	Ki67	55
5.3.3	Vimentina	58
6.	CONCLUSÕES	64
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
8.	TRABALHO CIENTÍFICO	82
	Anexo	98

Introdução

1. Introdução

A catarata é uma afecção ocular importante tanto na espécie humana quanto na canina, e seu tratamento é exclusivamente cirúrgico. No entanto, a remoção da lente resulta em hipermetropia com consequente comprometimento da visão; a correção desta hipermetropia é feita após implante de lente intraocular (LIO) com dioptria apropriada (GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; KIM et al., 2008).

A opacidade de cápsula posterior (OCP), denominada também como catarata secundária, é a complicação mais comum após a remoção cirúrgica da catarata. No decorrer da sua evolução, verifica-se crescimento, proliferação, migração e transformação das células do epitélio da lente (CEL) presentes na cápsula anterior remanescente, sob a cápsula posterior inicialmente livre de células (WORMSTONE, 2002; RAJ et al., 2009). Desta maneira, surge uma nova barreira à passagem da luz principalmente quando esta opacidade localiza-se no centro do eixo óptico.

Na medicina, sua incidência varia de 10 a 50% de acometimento, de acordo com a evolução de novas técnicas descritas, com o decorrer dos anos (SINGER et al., 2000). Na literatura veterinária, as taxas relatadas de desenvolvimento da OCP estão entre 68% e 100% dos cães no primeiro ano após a facoemulsificação e implante de LIO (BRAS et al., 2006; SIGLE; NASISSE, 2006). Para se minimizar o desenvolvimento da OCP, diversas técnicas são realizadas, dentre elas, modificações nos procedimentos cirúrgicos (PENG et al., 2000; NIKEGHBALI, 2002), utilização de fármacos específicos no saco capsular (MALOOF et al., 2003; DUNCAN et al., 2007; WORMSTONE et al., 2009), LIOs de materiais e formatos diversos, alteração dos materiais e formatos das LIOs, bem como associação dos procedimentos descritos (COOMBES; SEWARD, 1999; NISHI; NISHI, 1999; KATAYAMA et al., 2007; AWASTHI et al., 2009).

A modificação superficial dos materiais utilizados na confecção das LIOs vem sendo estudada nas últimas décadas, com o intuito de aumentar a biocompatibilidade das mesmas e induzir menor proliferação celular com a posterior manifestação da OCP (WILSON et al., 2001; CHU et al., 2002; BOZUKOVA et al., 2007).

O tratamento da LIO utilizando-se o processo de plasma, independentemente do plasma utilizado, promove a “ativação” da superfície, ou seja, a incorporação de grupos polares que modificariam suas características superficiais (efeito na adesão ou repelência celular e proteica) (COLTRO; ALVES, 2001; KIM et al., 2001). A polimerização das LIOs com teflon (WERNER et al., 1999), heparina (LUNDVALL et al., 2003) e titânio (YUAN et al., 2004) foi descrita com intuito de acrescentar características destas substâncias e, desta maneira, conferir repelência celular.

A repelência celular e proteica do polietilenoglicol (PEG), decorrente de suas propriedades atóxicas, não imunogênica e não antigênica, seleciona-o como substância adequada a ser aplicada nas superfícies dos materiais para a confecção de LIOs (KIM et al., 2001; BOZUKOVA et al., 2007; SERENO, 2012).

Em decorrência da alta taxa de frequência da OCP, observa-se o estudo crescente de diferentes métodos instituídos em sua prevenção (NISHI et al., 2000; RAJ et al., 2007, AWASTHI et al., 2009; SINHA et al., 2013). Desta forma, muitas pesquisas visam melhorar as técnicas cirúrgicas para eliminar quase todas da CELs do saco capsular, no momento da cirurgia, otimizando a biocompatibilidade das LIOs, minimizando as reações inflamatórias pós-operatória, e diminuindo CELs residuais por agentes terapêuticos e que apresentem o mínimo ou nenhum efeito em outros tecidos oculares, são altamente desejáveis (SINHA et al., 2013).

As considerações descritas acima, associada à alta morbidade da OCP na Medicina Veterinária, bem como os escassos estudos relacionados à mesma, especialmente com modificação na superfície da lente e avaliação da opacidade estimularam a realização deste estudo, o qual estudou, por meio de análise histopatológica e imunohistoquímica do saco capsular da lente, o efeito das LIOs tratadas com plasma de Flúor ou polietilenoglicol e LIO comercial na OCP coelhos submetidos à facoemulsificação.

Revisão da literatura

2. Revisão de Literatura

2.1 Catarata

Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que 161 milhões de pessoas em todo mundo sofrem com algum tipo de deficiência visual, das quais 37 milhões destas são cegas, sendo a catarata a principal causa (BAUMWORCEL, et al, 2009). Não existe um levantamento similar a este para cães, mas a catarata é uma condição frequente em cães e é considerada uma das principais causas de cegueira, e uma das doenças intraoculares mais frequentes também nesta espécie (GELATT; MACHAY, 2005).

O termo deriva da palavra latina *cataracta* e da expressão grega *kataraktes*, que significa cascata, queda de água, (KEIL, 2001). Desta forma, a catarata pode ser definida como a opacidade da lente ou de suas cápsulas, decorrente de alterações da arquitetura lamelar de suas fibras, alterações na orientação e nas relações entre as fibras - vacuolização, precipitação das proteínas da lente (BARNETT, 1985; BANKS, 1992; GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; GELATT, 2007).

A catarata pode ser classificada levando-se em consideração diferentes parâmetros, tais como: a idade do animal no momento do aparecimento (WHITLEY et al., 1993; GELATT, 2007); a posição anatômica da opacidade; o estágio de desenvolvimento da catarata; e a sua etiologia (BARNETT, 1985; FISCHER, 1989; DZIEZYC, 1990; WHITLEY et al., 1993; GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; GELATT, 2007).

A classificação baseada na idade do animal no momento da sua manifestação, determina as cataratas congênitas, as do desenvolvimento (juvenil e adulta) e as senis (WHITLEY et al., 1993; GELATT, 2007). Quando a classificação é decorrente da posição anatômica da opacidade, as cataratas são denominadas nucleares, corticais ou capsulares. Considerando-se, o estágio de desenvolvimento, as cataratas podem apresentar-se nas formas incipiente, imatura, madura e hipermetura. Quando a classificação é de acordo com a etiologia, as cataratas podem ser denominadas hereditárias, nutricionais, tóxicas, metabólicas e traumáticas (BARNETT, 1985; DZIEZYC, 1990; WHITLEY et al., 1993; GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; SLATTER, 2005; GELATT,

2007). As cataratas também podem ser classificadas em primárias e secundárias (BARNETT, 1985); sendo, as primárias, aquelas cujo olho acometido não possui referências anteriores de doença ocular e a lente é a única estrutura ocular acometida; e as cataratas secundárias são aquelas cuja opacidade é decorrente de alguma afecção em outra estrutura ocular, como por exemplo, íris, coróide ou retina. Tipicamente, as cataratas hereditárias primárias manifestam-se nas primeiras semanas ou meses de vida e são progressivas, porém nem todas culminam para acometimento total da lente e perda da visão. Quase sempre são bilaterais, mas nem sempre são simétricas. As cataratas hereditárias secundárias estão sempre associadas à outra afecção hereditária, entre elas, a persistência da membrana pupilar, atrofia progressiva de retina, luxação de lente e glaucoma primário (BARNETT, 1985; BARNETT, 1988). Além disso, endocrinopatias como o diabetes mellitus pode levar ao desenvolvimento da catarata. Beam et al. (1999) observaram que 50% dos cães desenvolvem catarata a partir de 5 a 6 meses do início do diagnóstico da diabetes.

A única terapia efetiva é sua remoção cirúrgica, a qual pode ser realizada por diversas técnicas. A facectomia intracapsular (FIC) foi praticamente abandonada, devido ao grande número de complicações pós-operatórias, sendo reservada apenas para casos de subluxação ou luxação total da lente (WILLIANS et al., 1996). Foi substituída pela técnica de facectomia extracapsular (FEC), a qual realiza uma abertura da cápsula anterior (capsulorrexe) e preserva a posterior. Este procedimento predominou até a década de 70, porém persistia o inconveniente da necessidade de uma grande incisão corneal ou límbica, a qual induz o colapso da câmara anterior e uveíte acentuada no pós-operatório (DZIEZYC, 1990; WHITLEY et al., 1993).

O desenvolvimento de aparelhos de ultrassom permitiu que, em 1967, fosse realizada a primeira remoção da lente usando um aparelho de facoemulsificador, a qual foi denominada de “facoemulsificação” (KECOVÁ; NECAS, 2004). Durante a facoemulsificação, as fibras do córtex e núcleo da lente com catarata são retiradas, permanecendo um saco capsular constituído pela cápsula posterior intacta e a cápsula anterior periférica à capsulorrexe (VASAVADA et al., 1997; RAJ et al., 2009). Assim, a técnica de escolha tem sido

a facoemulsificação (WILLIAMS et al., 1996; GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997), pela qual o núcleo da lente opacificada é removido após sua emulsificação e aspiração, sendo que as vantagens advêm do tempo cirúrgico reduzido, da pequena incisão e da reparação corneal precoce, além da redução do edema corneal, menor cicatriz e conseqüentemente redução significativa da inflamação no pós-operatório. Está técnica ainda promove melhor aspiração das massas corticais e maior estabilidade da câmara anterior no transoperatório (DZIEZYC, 1990; SLATTER, 2005; LAUS et al., 2008). Entre as limitações, incluem-se custos mais elevados e o tempo de treinamento do profissional (SLATTER, 2005; LAUS et al., 2008).

Com o advento da facoemulsificação houve uma acentuada elevação dos índices de sucesso deste tipo de cirurgia e, com ela, a busca de melhores resultados em termos de acuidade visual (DAVIDSON, 2001).

Devido à importância da função refrativa da lente, medidas devem ser levadas em consideração, pois as cirurgias de extração da lente produzem hipermetropias de aproximadamente 14 dioptrias, uma vez que no olho afático a luz não é suficientemente refratada, resultando na formação de imagem “atrás” da retina (GAIDDON et al., 1991; OFRI, 2007).

A correção da hipermetropia pode ser feita através da implantação de lentes intraoculares (LIOs), cuja utilização na Medicina foi realizada pioneiramente por Harold Ridley em 1949, empregando lentes de polimetilmetacrilato (PMMA). Por muitos anos, predominaram as LIOs rígidas de PMMA, que requerem incisões corneais amplas para sua implantação. O advento das lentes flexíveis e dobráveis permitiu a redução das incisões para 3 ou 4 mm, resultando em menor astigmatismo (KIM et al., 2008), além de um tempo cirúrgico menor (ADKINS et al., 2003).

Em oftalmologia veterinária, particularmente na cirurgia da catarata em cães, seguiu-se a mesma tendência. Há, na atualidade, dois tipos principais de lentes, as rígidas de PMMA (GILGER et al., 1993) e as dobráveis, de silicone (GAIDDON et al., 1997) ou acrílicas (KECOVÁ; NECAS, 2004), que são implantadas dentro do saco capsular.

2.2 Opacidade de cápsula posterior

Após o procedimento cirúrgico, as células do epitélio anterior da lente (CELS) que permaneceram aderidas à cápsula anterior remanescente, podem invadir o eixo visual ocasionando a dispersão da luz e, desta maneira, diminuindo a acuidade visual, condição conhecida como catarata secundária, associada principalmente à opacidade de cápsula posterior (OCP) (WORMSTONE, 2002; RAJ et al., 2009). A OCP é um processo dinâmico que implica essencialmente nos mecanismos de: proliferação, migração e diferenciação das CELs residuais (transição de células epiteliais para mesenquimais). Alguns autores ainda acrescentam o depósito de colágeno e a regeneração das fibras lenticulares como parte da patogênese da OCP (AWASTHI et al., 2009; RAJ et al., 2009). Desta forma, a OCP é consequência fisiológica de uma cirurgia de catarata sem complicações, e começa a se desenvolver nos primeiros meses do pós-operatório, levando a implicações clínicas de baixa acuidade visual em três ou quatro anos (WERNER et al., 1999; RAJ et al., 2009).

A OCP é descrita nas cirurgias de catarata desde o primeiro implante realizado por Harold Ridley. Na medicina, sua incidência em meados dos anos 80 e próximo aos 90 variava de 30 a 50%. Em 1995 era em torno de 25% e nos fins dos anos 90, passou a ser em torno de 10% (SINGER et al., 2000). Na medicina veterinária, em um estudo retrospectivo de 2011 a 2012, avaliando cães submetidos à facoemulsificação, observou-se que a complicação mais prevalente foi o desenvolvimento de opacidade da cápsula posterior. Na consulta de reavaliação dos 4 meses, 10 dos 21 animais avaliados apresentavam OCP, o que corresponde a cerca de 48%, e aos 6 meses pós cirurgia, a OCP foi detectada em 87,50% dos casos (GORDO, 2012).

A sobrevivência de uma população viável de CELs, após a facoemulsificação, é o alicerce da formação da OCP (APPLE 1992; AWASTHI et al., 2009; WORMSTONE et al., 2009). Assim, a principal causa de OCP é a metaplasia que ocorre nas células epiteliais remanescentes na cápsula (GOMES; PAULINO, 2001). O procedimento cirúrgico promove uma resposta reparadora com mudanças no potencial de sinalização celular, aumento nas taxas de proliferação, depósito e contração de matriz extracelular, eventos que

contribuem para a deterioração visual observada na OCP (RAKIC et al., 1997; BUEHL et al., 2005; DUNCAN et al., 2007; RAJ et al., 2009; WORMSTONE et al., 2009).

Na etiopatogenia da OCP, as CELs-A, que apresentam uma taxa mitótica mínima, proliferam-se, dando origem à metaplasia fibrosa (PANDEY et al., 2004), enquanto que as CELs-E, diferentemente das CELs-A, apresentam uma taxa mitótica alta, dando origem a novas fibras continuamente durante a vida, e, portanto são responsáveis pela formação de OCP proliferativa (PANDEY et al., 2004). Embora ambos os tipos celulares (A e E) possuam o potencial de produzir opacidade significativamente visível, a maior parte da opacidade definida como OCP é causada pela proliferação das CELs-E (PANDEY et al., 2004). Clinicamente, a OCP apresenta-se em dois tipos morfológicos: perolada ou proliferativa, e fibrosa. A primeira corresponde à proliferação das CELs-E, as quais adquirem o aspecto clínico de células edemaciadas que se agrupam como bolhas ou pérolas de Elschnig (*Elschnig's pearls*) crescendo no espaço entre as cápsulas e podendo invadir a cápsula posterior (RAJ et al., 2007). Na área periférica do saco capsular, estes processos não causam sintomas, uma vez que não invadem o eixo visual, não causando dispersão de luz e nem deterioração visual (HOLLICK et al., 1998).

Quando ocorre a sinéquia, ou adesão, da borda da capsulorexe anterior com a cápsula posterior, a população de células lenticulares em crescimento desde o equador fica retida entre as cápsulas, porém, sem poder crescer além da capsulorexe sinequiada, deixando o eixo visual livre de células e sem OCP. Esta proliferação/regeneração das CELs-E é denominada anel de Soemmering's (WORMSTONE, 2002; RAJ et al., 2007).

As CELs-E respondem a um sistema de sinalização autócrino ou parácrino mediado por diversas citocinas e fatores de crescimento tais como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e interleucinas (IL-1 e IL-6), os quais têm demonstrado participação na regulação *in vitro* da proliferação de tais células (WORMSTONE, 2002; AWASTHI et al.,

2009). Outra manifestação clínica observada refere-se à proliferação e diferenciação, ou metaplasia fibrosa anormal das CELs-A em células alongadas ou miofibroblastos. Reação mediada pelo TGF- β (Fator de crescimento transformador β) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF) que promovem o aspecto clínico de pregas ou rugas na cápsula posterior (WORMSTONE, 2002; WORMSTONE et al., 2009). Ambas as formas não se excluem, assim a combinação dos dois tipos celulares é comumente encontrada na avaliação da OCP (RAJ et al., 2007).

A contração da capsulorexe anterior, denominada fimose capsular, é uma complicação relacionada à proliferação fibrosa da sua borda, e constitui uma característica notada frequentemente em capsulorexes pequenas, com diâmetros menores que 5,5mm (WERNER et al., 2004).

Áreas de OCP não são homogêneas e seus efeitos visuais dependem da relação entre sua localização no eixo visual e a dilatação pupilar, porém, 3,0 mm ao redor do eixo visual central é considerada geralmente como a área visual mais significativa (BUEHL et al., 2005; JOSE et al., 2005). Além disso, áreas de alta densidade de OCP fibrosa, que poderiam ser consideradas clinicamente graves, podem ter menos efeito deletério sobre a visão do que as áreas menos intensas de OCP perolada. Isto é explicado porque áreas fibrosas podem atenuar a passagem da luz, no entanto, áreas proliferativas atuam na dispersão intensa da mesma (BUEHL et al., 2005; JOSE et al., 2005). A diminuição da acuidade visual nem sempre é correspondente à intensidade da OCP visibilizada no exame oftalmológico direto, sendo que, às vezes, a mesma é intensa, mas, ainda assintomática em termos visuais (CHENG et al., 2001; PANDEY et al., 2004).

2.2.1 Causas e Incidências

As causas do OCP são multifatoriais, (APPLE, et al., 1992; RAM et al., 2001), e diversos são os fatores relacionados com a sua ocorrência, dentre eles, a inflamação pré e pós-operatória da catarata, a técnica cirúrgica utilizada, além das características da LIO, como formato e material (ABELA-FORMANEK et al., 2002a; ABELA-FORMANEK et al., 2002b; KATAYAMA et al., 2007).

Em humanos, o intervalo entre a facoemulsificação e as manifestações das características clínicas da OCP pode variar de três meses a quatro anos após a cirurgia (PANDEY et al., 2004). Há variações também entre espécies quanto ao tempo de manifestação da OCP; em coelhos, por exemplo, amplamente utilizados como modelos experimentais, a proliferação e manifestação da OCP é acelerada, podendo se apresentar logo nas primeiras seis a oito semanas de pós-operatório, o que corresponderia a aproximadamente dois anos em humanos (WERNER et al., 2004).

Na medicina, nota-se uma frequência média de 12% no primeiro ano de pós-operatório; 21% aos três anos e 28% após cinco anos de cirurgia (SCHAUMBERG et al., 1998). Na literatura veterinária, verifica-se que entre 68% e 100% dos cães desenvolvem OCP no primeiro ano após a facoemulsificação e implante de LIO (BRAS et al., 2006; SIGLE; NASISSE, 2006).

Na medicina, observa-se uma maior incidência de OCP na população míope quando comparada à população normal, que varia de 40 a 60%, e seu tratamento também está associado o maior número de complicações (IGNAJATOVIC, 1998; IZA'K et al., 1998).

Sabe-se que existe uma correlação inversa entre aparecimento da OCP e a idade do paciente (PANDEY et al., 2002), portanto sua ocorrência é uma certeza em pacientes pediátricos (PANDEY et al., 2001; PANDEY et al., 2002); o mesmo comportamento é descrito na medicina veterinária, uma vez que cães jovens apresentam mais OCP que os animais mais velhos (BRAS et al., 2006). O sexo, a lateralidade do olho (direito ou esquerdo) e presença de catarata diabtogênica não influenciam na incidência de OCP (BRAS et al., 2006). Em seres humanos, o índice de OCP também foi semelhante em pacientes diabéticos e não diabéticos com catarata, avaliados um ano pós-facoemulsificação (ZACZEK; ZETTERSTROM, 1999).

Cães de raças pequenas e médias parecem desenvolver significativamente mais OCP em comparação com cães de raças grande/gigantes (BRAS et al., 2006).

Quanto ao estágio de desenvolvimento da catarata apresentada pelo paciente, observou-se que este parece influenciar no desenvolvimento da OCP

(ARGENTO et al., 1992; BRAS et al., 2006). Pacientes humanos com catarata madura apresentam menor tendência de desenvolver OCP quando comparada a outros estágios, bem como aqueles com cataratas completas (ARGENTO et al., 1992). De modo similar, cães com catarata imatura apresentam aumento significativo na formação de OCP (BRAS et al., 2006).

2.3.2 Avaliação clínica e histológica

Dentre as possíveis avaliações para identificação da OCP são descritas a avaliação clínica, histopatológica macroscópica e microscópica, além da imunohistoquímica.

Camparini et al. (2000) investigaram a eficácia da avaliação por imagens por retroiluminação e observaram que estas fotografias apresentam uma boa capacidade para captar a presença e gravidade de OCP, mas que somente o uso de imagens por retroiluminação podem subestimar a avaliação. Findl et al. (2003) compararam quatro métodos de avaliação para quantificar OCP, sistema de análise totalmente automatizado (AQUA), avaliação subjetiva de opacidade por examinadores experientes e inexperientes, avaliação subjetiva de opacidade de cápsula posterior do sistema EPCO e o software de opacificação da cápsula posterior (POCOman). Concluíram que a pontuação do sistema AQUA apresenta correlação com os métodos subjetivos de avaliação, incluindo o EPOC, e que o sistema POCO, avalia a área de OCP e descreve adequadamente a intensidade da OCP (FINDL et al., 2003).

Segundo Werner et al. (2004 e 2005), as análises histopatológicas da OCP em olhos de coelhos foram fundamentais para complementar o entendimento dos resultados da OCP observados macroscopicamente.

Em estudos histológicos, descrevem-se que os achados morfológicos e de metaplasia que caracterizam a OCP, são semelhantes entre cães e humanos (COLITZ et al., 2000; DAVISON et al., 2000).

Imediatamente após a facoemulsificação, na avaliação histológica de fragmentos das cápsulas, anterior e posterior, notou-se uma monocamada de células epiteliais da lente na superfície interna da cápsula anterior, e ausência destas células na cápsula posterior. No entanto, após aproximadamente 19

meses à facoemulsificação e implante de LIO, as cápsulas da lente apresentavam-se unidas, e células mononucleares, presumivelmente células epiteliais da lente, foram observadas entre as cápsulas da lente (SAIKA et al., 1998).

Para avaliar o comportamento das CELs residuais após capsulorexe, Saxby et al. (1998) realizaram cultivo com cápsulas anteriores e posteriores da lente de humanos e bovinos por um período de 12 semanas. O intuito era avaliar a proliferação, migração e a metaplasia das células epiteliais da lente. As cápsulas foram coletadas e isoladas em meio de cultura estéril, não tóxico, sendo que um meio de cultura continha soro fetal de vitela e o outro meio era livre de soro fetal. Na análise histológica, foi observado o crescimento de células epiteliais, formando uma monocamada de células na cápsula posterior, em ambas as espécies avaliadas e meios de cultivo, sendo que esta cápsula apresentava-se inicialmente livre deste epitélio. A diferença de crescimento deu-se apenas na taxa de crescimento, o qual foi menor no meio livre de soro fetal (SAXBY et al., 1998). Ainda na análise histológica, foram observadas, no último momento da avaliação, multicamadas, atingindo um máximo de cinco e doze camadas de células na cápsula posterior humana e bovina, respectivamente (SAXBY et al., 1998).

Além do epitélio lenticular na cápsula posterior, Saxby et al. (1998) observaram a presença de rugas ou dobras em todas as amostras em momentos mais tardios do estudo. Após dez dias de avaliação, Wong et al. (2004) também relataram a presença evidente de uma camada de células epiteliais nas cápsulas posteriores humanas cultivadas, bem como a presença de rugas na mesma.

Na análise biomicroscópica da cápsula posterior, em coelhos submetidos à facoemulsificação e implante de LIO, foram descritas, aos dois meses de pós-operatório, dobras capsulares localizadas e presença de fibrose, bem como OCP do tipo perolada. Na avaliação histopatológica, olhos do grupo controle, ou seja, olhos com LIO comercial, não contendo microesferas de liberação lenta de ciclosporina, apresentaram proliferação e migração das células epiteliais da lente significativa na cápsula posterior (PEI et al., 2013).

2.3.3 Tratamento

Inicialmente a opacificação da cápsula posterior era abordada a partir da dissecação cirúrgica da cápsula posterior, que poderia ser realizada no momento da correção da catarata ou posteriormente (MURRILL et al., 1995). Tal procedimento apresentava complicações esperadas de uma cirurgia invasiva, que incluíam endoftalmite, deslocamento da LIO, perda de células endoteliais, perda vítrea e até descolamento de retina (WEIBLINGER, 1986). No início dos anos 80, a aplicação de laser de Nd: YAG para o tratamento da OCP foi apresentada por Aron-Rosa (1980) e Fankhauser (1981). A capsulotomia por laser de Nd:YAG tornou-se uma alternativa eficaz e segura para dissecação cirúrgica, evitando complicações como endoftalmite (ASLAM et al., 2003).

Na maioria dos casos, OCP pode ser eficazmente tratada com uma capsulotomia posterior com laser de Nd:YAG. Tal procedimento é considerado o método ideal, pois não requer hospitalização ou preparo pré-operatório do paciente, não requer anestesia geral, é um procedimento indolor, apresenta maior segurança e precisão, os riscos e complicações são menores, menor trauma ocular, menos inflamação pós operatória, exige pouca ou nenhuma medicação pós operatória, e é um procedimento relativamente rápido. Porém, depende de uma transparência da córnea e do humor aquoso para uma efeito mais eficaz e necessita de controle prévio da pressão intraocular (TERRY; STORK, 1996; SMITH et al., 1999; GE et al., 2000). Além disso, é um procedimento de elevado custo, representando uma grande parte do custo total da cirurgia de catarata (STEINBERG et al., 1993).

2.3.4 Prevenção

Nos últimos anos, a compreensão dos mecanismos de desenvolvimento da OCP aumentou significativamente; por conseguinte, uma série de avanços têm sido feitos para melhorar as técnicas de cirurgia de catarata, materiais e formatos das LIOs e a utilização de agentes terapêuticos. Devido a essas melhorias, a ocorrência de OCP diminuiu ou pelo menos o seu início foi adiado. No entanto, a OCP continua sendo a complicação mais comum da cirurgia de catarata, especialmente em crianças e adultos jovens (SINHA et al., 2013).

A capsulotomia anterior ou capsulorexe é um dos passos críticos para a execução da facoemulsificação e considerada etapa importante na prevenção da OCP pós-cirurgia. Duas técnicas principais foram desenvolvidas: a capsulotomia “*can-opener*” (abridor de latas) e a capsulorexe circular contínua (CCC) (NIKEGHBALI, 2002). Seu formato e tamanho influenciam no aparecimento de OCP, pois quanto maior o diâmetro da capsulorexe, maior a incidência da OCP (SPALTON, 1999). A criação de uma capsulorexe ampla, com bordas irregulares em ziguezague como na técnica do “abridor de latas” apresenta maiores índices de OCP, devido ao menor contato da cápsula anterior residual com a LIO, interferindo no efeito barreira (RAVALICO et al., 1996, NIKEGHBALI 2002, WEDJE et al., 2004). A CCC é a técnica de capsulotomia de escolha pela maioria dos cirurgiões (NIKEGHBALI, 2002; APPLE, 2007). A OCP mais acentuada tem sido relatada com capsulorexe descentrada (WEDJE et al., 2004).

Taxas de OCP descritas variam considerando diferentes técnicas de facectomia (PERSHING; KUMAR, 2011). Na comparação clínica em procedimentos cirúrgicos (facoemulsificação e extração extracapsular de pequena incisão - SICS), observou-se, após 6 meses de pós-operatório, taxas de OCP maior na extração extracapsular; sendo descrito 40% no grupo SICS contra 15% no grupo facoemulsificação (RUIT et al., 2007; PERSHING; KUMAR, 2011). Acredita-se que isto ocorra devido uma capsulotomia parcialmente descontínua observada no grupo SICS (RUIT et al., 2007; VENKATESH et al., 2010).

Vários avanços foram feitos objetivando melhorar a biocompatibilidade das LIOs, considerando reações do tipo corpos estranhos, compatibilidade uveal e interação das mesmas com as CELs e sua influência na OCP. A maioria das pesquisas estão relacionadas aos efeitos das LIOs, dos diferentes materiais, no comportamento das CELs e sua contribuição na inibição da OCP (HOLLICK et al., 1998; COOMBES; SEWARD 1999; NISHI; NISHI, 1999; NISHI et al., 2000, MIYATA et al., 2007, RAJ et al., 2007, AWASTHI et al., 2009).

A porcentagem de pacientes humanos contendo CELs na cápsula posterior após implante de LIO de PMMA e acrílica, aos 90 dias de pós-operatório, foi de

93% e 46%, respectivamente. Após dois anos da colocação da LIO, 100% dos pacientes com LIO de PMMA e de silicone apresentaram CELs na cápsula posterior, ao passo que 62% dos pacientes com LIO acrílica. Mais de 80% dos pacientes com LIO de PMMA apresentaram um desenvolvimento progressivo das CELs entre 90 dias e 2 anos, bem como 84% dos pacientes com LIO de silicone, enquanto que nenhum paciente com LIO acrílica apresentou crescimento progressivo das CELs (HOLLICK et al., 1998). Hollick et al. (1998) concluíram que o material da LIO influencia no desenvolvimento da OCP, atuando no comportamento das CELs.

A borda óptica da LIO é fundamental na formação da barreira física (WERNER et al., 2004). Segundo esses autores, após avaliação clínica e histopatológica de diferentes modelos de lentes intraoculares acrílicas hidrofílicas de borda quadrada em coelhos, concluiu-se que LIOs de borda quadrada (360°) proporcionam melhores resultados quanto à diminuição na formação da OCP (WERNER et al., 2004). Por ter uma borda mais definida e quadrada, a LIO acrílica apresenta maior função como barreira mecânica na migração das CELs para a cápsula posterior, além de maior bioadesão entre a LIO e a cápsula da lente; maior a adesão, significa menor espaço para as CELs migrarem em direção à cápsula posterior, afirmando a idéia de “sem espaço, não há células células” (APPLE et al., 1992; HOLLICK et al., 1998). Alternativamente, acredita-se que mais do que o efeito barreira, esta adesão restringe o acesso de nutrientes e fatores de crescimento para CELs que migraram e, portanto resulta na regressão e atrofia destas células (HOLLICK et al., 1998).

Outros procedimentos associados ao desenvolvimento da OCP são a hidrodissecção, a dispersão de determinados fármacos no saco capsular e o polimento minucioso da cápsula anterior e posterior. A hidrodissecção mediante a injeção de fluxo contínuo de BSS (solução salina balanceada), através de uma cânula apropriada permite a separação do córtex e o núcleo da lente, das suas cápsulas no transoperatório (PENG et al., 2000a). A mesma é associada à redução da OCP (PENG et al., 2000a; BEKIBELE; MUSORO, 2005).

Fármacos também têm sido usados com intuito de minimizar/evitar a proliferação e a migração da CELs. A utilização de solução de Lidocaína 1% na

hidrodissecção foi mencionada como benéfica, auxiliando na limpeza cortical, diminuindo a aderência das CELs à cápsula lenticular ou por toxicidade celular direta. Entretanto, a toxicidade corneal continua sendo a grande preocupação quando são utilizados agentes hipotônicos (VARGAS et al., 2003). O principal objetivo de qualquer terapia farmacológica é atingir diretamente o tecido alvo e prevenir a toxicidade dos demais. Desta maneira, afetar unicamente a população celular remanescente da cápsula anterior e do saco capsular, evitando a toxicidade corneal e dos demais tecidos intraoculares é de vital importância. Para isto o sistema chamado “the perfect capsule” (Milvella®, Austrália) foi desenvolvido. O sistema permite a remoção das CELs em um procedimento denominado irrigação da cápsula selada (SCI-Sealed Capsule Irrigation), no qual ocorre a distribuição de fármacos dentro do saco capsular, por um determinado período de tempo e sua posterior remoção utilizando-se uma porta de aspiração (MALOOF et al., 2003, DUNCAN et al., 2007, WORMSTONE et al., 2009). Água destilada, cloreto de sódio, 5-fluorouracil e Tapsigargina foram as substâncias testadas por Duncan et al. (2007), os quais observaram menor incidência de OCP após utilização dos últimos dois fármacos.

A irrigação e aspiração manual do córtex e o polimento minucioso das cápsulas tem facilitado o acesso às CELs residuais dos fórnices capsulares (VASAVADA et al., 2006; RAJ et al., 2009). Sua remoção minuciosa e o polimento capsular reduzem o número de CELs mitoticamente ativas com potencial de proliferar e migrar para o eixo visual (PENG et al., 2000a, b).

Adicionalmente, o polimento da cápsula anterior tem sido citado como benéfico na diminuição da fibrose e contração da mesma (OCA) (MENAPACE et al., 2005). Existem trabalhos que preconizam o polimento das LIOs e cápsula posterior com materiais cirúrgicos adequados visando minimizar a incidência de OCP (PENG et al., 2000a). O tratamento superficial dos materiais utilizados na confecção das LIOs tem sido feito com o intuito de modificar as interações entre estas e os meios biológicos. Considera-se que a polimerização das superfícies com substâncias específicas poderia induzir aumento na biocompatibilidade e interferir na proliferação celular e posterior manifestação da OCP (WILSON et al., 2001).

O tratamento por “plasma” consiste na submissão da LIO a uma “nuvem” uniforme de gás ionizado. A indução de tal modificação superficial permitirá tornar as LIOs receptivas para a polimerização subsequente de outras substâncias (WILSON et al., 2001; WILSON et al., 2003; YUEN et al., 2006; BOZUKOVA et al., 2007). O efeito do tratamento por plasma é determinado pelo tipo de reação química entre a superfície bombardeada pelo plasma e as moléculas reativas presentes no material. Assim, as mudanças que ocorrem no substrato dependem da composição química deste e dos gases utilizados (ar, nitrogênio/N₂, argônio/Ar, oxigênio/O₂, ozônio/O₃, óxido nitroso/NO₂, hélio/He, vapor de água, gás carbônico/CO₂, metano/CH₄ ou amônia/NH₃). Cada gás produz um plasma distinto, resultando em propriedades superficiais diferentes nos materiais tratados (COLTRO; ALVES, 2001).

A utilização de grupos fluorados, como hexafluoreto de enxofre ou tetrafluorocarbono, é capaz de conferir alta hidrofobicidade às superfícies favorecendo à biointegração dos materiais biológicos (WERNER et al., 1999). O tratamento do plasma permite alterar os grupos funcionais da superfície de LIOs, tornando-o mais hidrofílico ou mais hidrofóbica. Um estudo *in vitro* mostrou menor ativação de granulócitos e menor aderência à superfície de LIOs de PMMA depois do tratamento por plasma de tetrafluorocarbono (CF₄) (ELOY et al., 1993). Ainda, Eloy et al. (1993) destacaram o efeito positivo na repelência celular nas superfícies fluoradas. Legeais et al. (1998) mostraram, em um estudo *in vivo*, efeitos antiadesivos nas LIOs tratadas com substâncias fluoradas, e acreditaram que isso ocorra devido a sua natureza altamente hidrofóbica. Ainda, o depósito nas superfícies das LIOs foi significativamente menor até 60 dias após o tratamento da LIO (LEGEAIS et al., 1998). Sereno (2012) concluiu que a utilização de LIOs tratadas com plasma de Flúor não causa sinais oftalmológicos, como fotofobia, hiperemia, alterações na pressão intraocular e nem alterações endoteliais e da espessura corneal, demonstrando assim a biocompatibilidade destas lentes e segurança no uso de tal substância.

Para ser realmente efetiva, a substância polimerizada sobre as LIOs não só deve ter ação repelente celular como também proteica, sendo características vinculadas ao polietilenoglicol (PEG). O PEG, um polímero hidrofílico

(WAZAWA et al., 2006), é uma substância biodegradável, atóxica, insolúvel em água a elevadas temperaturas, não imunogênica e não antigênica com a conhecida característica da repelência e antiaderência celular e proteica (KIM et al., 2001; LI, 2001; BOZUKOVA et al., 2007). Kim et al. (2001) identificaram menor incidência de adesão celular na superfície do PMMA polimerizado com PEG utilizando plasma de ozônio em testes *in vitro* e *in vivo*. Em um estudo comparativo entre PEG de três molaridades diferentes (1100, 2000, e 5000 g/mol) foi ressaltado não somente o efeito repelente do PEG cobrindo os materiais das LIOs, como também, quanto maior a massa molar do PEG, maior o impacto nas propriedades antiaderentes do mesmo (BOZUKOVA et al., 2007). Outro estudo usando lentes de acrílico com superfície modificada com PEG descreveu formação de OCP, no entanto significativamente menos grave no grupo de PEG/LIO que no grupo controle, no qual foi observada a formação de OCP a partir da terceira semana pós-operatória (LEE et al., 2007). Além disso, a opacificação apareceu como uma fibrose no grupo PEG/LIO, sugerindo reduzida deficiência visual para LIOs tratadas com PEG. (LEE et al., 2007). Neste mesmo estudo, foi concluído que a modificação da superfície de LIO acrílica com PEG pode reduzir a formação de OCP durante a fase precoce.

O uso de inibidores de fatores de crescimento e /ou de enzimas como as metaloproteinases (MMPs) tem sido alvo de estudo no que diz respeito à prevenção no desenvolvimento da OCP (WONG et al., 2004; MORARESCU et al., 2010). Observa-se que a migração das células epiteliais da lente para cápsula posterior foi significativamente reduzida nas cápsulas tratadas com inibidores de MMPs (WONG et al., 2004), sugerindo que a administração dos inibidores tem potencial para minimizar a OCP (MORARESCU et al., 2010). Wong et al. (2004) concluíram que a inibição das MMPs resultou em redução da migração da células epiteliais e subsequente redução da contração e enrugamento da cápsula posterior, e portanto na redução da OCP. Além disso, a utilização de inibidores de MMP em LIOs pode representar uma solução promissora para reduzir a incidência de formação de OCP (MORARESCU et al., 2010).

O uso de LIO como reservatórios de microesferas contendo fármacos de liberação lenta também tem sido investigado, objetivando avaliar sua eficácia na prevenção e/ou diminuição do desenvolvimento da OCP (LIU et al., 2013; PEI et al., 2013). Em estudo experimental com coelhos submetidos à facoemulsificação e colocação de LIO contendo microesferas de liberação lenta de ciclosporina, foi descrito na análise biomicroscópica, que após três meses de pós-operatório, 65% dos animais tratados não apresentavam OCP, enquanto 25% do grupo controle não apresentavam (PEI et al., 2013). Já na avaliação histopatológica, os olhos controle apresentavam proliferação e migração das células epiteliais da lente significativa na cápsula posterior (PEI et al., 2013). Desta forma, uma ampla variedade de fármacos *in vitro* e *in vivo* utilizados nas LIOs para serem liberados lentamente com intuito de inibir a formação da OCP, como 5-fluorouracil, mitomicina C, diclofenaco de sódio, rapamicina vem mostrando-se promissora no tratamento de inflamação, infecção e opacificação da cápsula posterior após a cirurgia de catarata; no entanto, novos estudos são ainda necessários para avaliar as complicações potenciais para alcançar ampla utilização na clínica médica (LIU et al., 2013).

Todas as técnicas, com diferentes graus de sucesso, tendem a diminuir a OCP ou mesmo retardar o seu desenvolvimento (WERNER et al., 2004, AWASTHI et al., 2009).

2.3 Opacidade de cápsula anterior e interlenticular

Adicionalmente à OCP, a proliferação das CELs está envolvida na patogênese de outras entidades como a opacidade de cápsula anterior (OCA) e a opacidade interlenticular (OIL) que ocorre entre as duas LIOs dispostas de maneira dupla dentro do saco capsular (lentes em “Piggy back”) (PANDEY et al., 2004; RAJ et al., 2009). A OCA constitui a opacidade da cápsula anterior residual, após a capsulorexe, pela proliferação fibrosa das CELs-A, a qual pode ser pronunciada em olhos com capsulorexe que se sobrepõe à LIO, ou seja, menor diâmetro desta em relação ao disco óptico da LIO. Alguns estudos destacam o material da LIO como fator predisponente ao aparecimento da OCA (SAIKA et al., 2003; SACU et al., 2004). A maior incidência de OCA foi associada

à utilização de LIOs de silicone, quando comparadas às LIOs acrílicas (WERNER et al., 2000; WERNER et al., 2004).

2.4 Imunohistoquímica

Estudos por imunohistoquímica revelam que os achados morfológicos, e de metaplasia que caracterizam a OCP, são semelhantes entre cães e humanos (COLITZ et al., 2000; DAVISON et al., 2000).

A imunohistoquímica (IHQ) é uma técnica que permite a localização de antígenos em células de uma amostra de tecido fixado, explorando o princípio da ligação específica de anticorpos a antígenos no tecido biológico; para a análise dos resultados, é bastante utilizada a microscopia de luz (RAMOS-VARA, 2005). O nome da técnica provém das raízes "imuno", em referência aos anticorpos utilizados no procedimento, e "histo", significando tecido; esta técnica tem sido largamente aplicada para fins de diagnóstico e pesquisa (BURNIER et al., 1988). Apesar de ser um método relativamente simples, a imunohistoquímica tem certas particularidades e seu resultado é influenciado por diversos fatores, fixação do espécime, processamento histológico adequado, escolha dos anticorpos a serem analisados em cada caso e pelas reações propriamente ditas e chegando até a interpretação das lâminas (WERNER et al., 2005).

A seguir, serão apresentados alguns marcadores e sua relação com a OCP.

2.4.1 Alfa-actina

A actina é um microfilamento proteico, estrutural e contrátil que identifica o isótopo alfa da actina de músculo liso e reage com células musculares lisas normais, neoplásicas e células mioepiteliais (ZUCARRI et al., 2002). Algumas células, como as mediadas pelos fatores de crescimento transformador β e de crescimento de fibroblastos são positivas à alfa-actina, que é uma proteína que em conjunto com a miosina e moléculas de ATP gera movimentos celulares. Sabe-se ainda, que alfa-actina é expressa nos chamados miofibroblastos repovoados no tecido de uma ferida, por exemplo, e por isso é considerada a responsável pela contração no processo de cura de feridas do tecido conjuntivo

(DARBY et al., 1990;. GRINNELL, 1994). Durante a cicatrização de feridas, células fibroblásticas repovoam o tecido conjuntivo, que são identificadas como miofibroblastos. Estas células são, portanto, responsáveis pela contração das feridas de cicatrização (DARBY et al., 1990;. GRINNELL, 1994).

As CELs A são positivas à alfa-actina e, segundo alguns autores, responsáveis pela contração e enrugamento da cápsula posterior o (WORMSTONE, 2002; WORMSTONE et al., 2009). A proliferação de células epiteliais da lente no saco capsular, em associação com o acúmulo de tecido conjuntivo após a extração de cataratas é considerado o processo de cicatrização de feridas da lente. O saco capsular contrai em uma fase posterior de cura (NISHI; NISHI, 1999). A proliferação de células epiteliais da lente pode contribuir para a contração da cápsula. Da mesma forma, cápsulas posteriores caninas cultivadas exibiam positividade para alfa-actina, e esta expressão foi vista predominantemente em associação com errugamento capsular (DAVIDSON et al., 2000).

2.4.2 Ki67

A proteína Ki-67 trata-se de uma IgG1 de camundongo produzida contra uma fração nuclear da linhagem celular L428 do linfoma de Hodgkin (GERDES et al., 1983; BROWN; GATTER, 1990).

O anticorpo foi identificado no início da década de 80; seu nome é derivado da cidade de origem dos pesquisadores (Kiel – Alemanha), e o número 67 referindo-se ao número de clones (GERDES et al., 1983). Um importante marcador de proliferação celular, sendo reativo com uma estrutura nuclear presente nas células em proliferação exclusivamente. É expresso em todas as fases do ciclo celular G1, S, G2, no entanto a expressão antigênica é negativa nas células quiescentes, ou na fase G0. (GERDES et al., 1983; GERDES et al., 1984; HALL; LEVISON, 1990). O Ki-67 apresenta uma meia vida curta, cerca de uma hora, sendo uma vantagem pois garante a ausência de marcação das células que tenham saído do ciclo celular (BRUNO; DARZYNKIEWICZ, 1992).

Por estar presente em todas as células proliferativas (células normais e tumorais), o Ki-67 tornou-se um excelente marcador operacional para determinar

a fração de crescimento de uma população de células. Assim, os anticorpos contra a proteína Ki-67, estão sendo cada vez mais utilizados como ferramentas de diagnóstico em diferentes tipos de tumores, mas é importante ter em mente que a expressão do Ki-67 fornece, somente, a informação de estar ou não, uma célula em proliferação, mas não há como prever sobre a duração de seu ciclo celular (ARISAWA et al., 1999).

Embora pareça ter uma importante função na divisão celular, o seu papel exato ainda é obscuro (YERUSHALMI, 2010), pois poucos estudos relatam a possibilidade do uso do Ki-67 com a finalidade de acessar o potencial terapêutico benéfico da utilização de drogas antiproliferativas (ARISAWA et al., 1999).

2.4.3 Vimentina

As células eucarióticas possuem diversos tipos de proteínas filamentosas citoplasmáticas, microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários (FIs). Os FIs compõem um sistema de estruturas filamentosas, no citoplasma e núcleo de células eucarióticas, diferente dos microfilamentos de actina, dos microtúbulos, que são constituintes do citoesqueleto das células de quase todos os vertebrados. Os primeiros relatos, encontrados na literatura, definiam cinco tipos de FIs nas células dos vertebrados, distribuídos nos tecidos da seguinte maneira: citoqueratinas (tecido epitelial), vimentina (tecido mesenquimal), desmina (tecido muscular), proteína glial fibrilar ácida (astrócitos), neurofilamentos (neurônios) (LAZARIDES, 1982).

A vimentina, uma proteína de peso molecular de 57 kD, é um filamento intermediário tipo III, e é expressa na maioria das células de origem mesenquimal, incluindo fibroblastos, células endoteliais que revestem os vasos, músculo liso, macrófagos, neutrófilos, melanócitos, linfócitos T e B, e também em células de origem não mesenquimal (LAZARIDES, 1982; COCHARD; PAULIN 1984; POLAK; NOORDEN, 1986; EVANS, 1998). Devido alta insolubilidade da vimentina, sugere-se que esta apresente uma função estrutural no citoplasma, além de evidências bioquímicas e morfológicas indicarem que os filamentos de vimentina estão associados à membrana nuclear e plasmática, mantendo a posição do núcleo e do fuso mitótico, durante a vida da célula

(CHOU et al., 1989). A vimentina é importante por ser um marcador bem conhecido na transição epitelial-mesenquimal (EMT) (THIERY, 2002).

As células epiteliais da íris e da lente não possuem queratina e sim, vimentina como filamento intermediário componente do citoesqueleto (LAZARIDES, 1982).

Sabe-se da importância da vimentina na transição epitelial-mesenquimal, no entanto, não se sabe se a vimentina funcionalmente contribui para o padrão de expressão do gene responsável pela EMT ou se a expressão de vimentina é apenas um resultado de EMT (EVANS, 1998). A transição epitélio mesenquimal está diretamente relacionada ao desenvolvimento da OCP, conforme descrito anteriormente (SHIRAI et al., 2004).

Objetivos

3. Objetivos

Objetivo Geral:

- Avaliar e comparar a cápsula posterior da lente, por meio de análise histopatológica, após facoemulsificação e implante de lente intraocular (LIO), modificada com plasma de Flúor ou de polietilenoglicol (PEG), em coelhos.

Objetivos Específicos:

- Identificar as alterações histomorfológicas da cápsula posterior após colocação de LIO;
- Comparar o efeito do tratamento de LIOs tratadas com plasma de Flúor e polietilenoglicol, implante de LIO comercial, bem como facoemulsificação sem implante de LIO, na análise histológica e morfométrica da cápsula posterior.
- Analisar a imunomarcacão do saco capsular, considerando-se os marcadores alfa-actina, Ki67 e vimentina, e comparar entre os diferentes tratamentos instituídos.

Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados 40 olhos de animais da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Norfolk, do sexo fêmea, com idade variando entre 70 e 100 dias, e com peso entre 2 e 3 Kg. Os coelhos foram fornecidos pelo Biotério Central da UNESP campus de Botucatu.

Os animais foram previamente submetidos aos exames clínicos e oftalmológicos de rotina com auxílio de lâmpada de fenda portátil¹, teste de Schirmer², tonometria³ e oftalmoscopia direta⁴, a fim de se descartar qualquer alteração ocular.

4.2 Aspectos éticos

Os procedimentos experimentais desenvolvidos seguiram as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) e foram submetidos à Câmara de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu, protocolo nº 041/2012.

4.3 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos experimentais, constituídos por 10 animais, designados de acordo com o tipo de tratamento efetuado: Grupo com LIOs sem tratamento (GL), Grupo com LIOs submetidas à ativação superficial por plasma de Flúor (GF), Grupo com LIOs polimerizadas com polietilenoglicol (GPEG) e Grupo controle, submetidos apenas ao procedimento cirúrgico de facoemulsificação, sem LIO (GC).

¹ Lâmpada de fenda portátil Kowa SL-15®

² Teste de Schirmer Ophthalmos® - Brasil

³ Tonômetro de aplanção Tono Pen® Medtronic

⁴ Oftalmoscópio direto Welch Allyn®

4.4 Procedimentos anestésicos e cirúrgicos

O experimento foi conduzido no Centro Cirúrgico de Pequenos Animais do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu-SP.

Os animais foram anestesiados utilizando-se como medicação pré anestésica: quetamina⁵ (20 mg/Kg) associada à xilazina⁶ (1 mg/kg) por via intramuscular (IM) e morfina⁷ (0,5mg/Kg) por via IM. A anestesia tópica ocular foi realizada utilizando-se colírio à base de proxicetacaína 0,5%⁸.

Todos os animais foram submetidos à técnica de facoemulsificação bimanual e implantação ou não de lente intraocular dobrável acrílica hidrofílica⁹, dependendo do seu grupo experimental.

No pós-cirúrgico imediato, o meloxicam¹⁰ (0,2 mg/kg/IM) foi administrado bem como, durante três dias pós-operatório (0,1mg/kg), a cada 24 horas por via subcutânea. Como profilaxia tópica antimicrobiana e antiinflamatória foram administrados colírio de tobramicina 0,3%¹¹ e colírio de acetato de prednisolona 1%¹², e para controle da hipertensão ocular pós operatória foi instilado colírio de brimonidina¹³ 0,03% a cada 6 horas durante 10 dias.

Após o procedimento cirúrgico os animais foram identificados e mantidos em gaiola individuais com água potável e ração comercial *ad libitum*. Os animais foram submetidos a exames clínicos e oftalmológicos rotineiramente.

4.5 Momentos de Avaliação

Ao final de 12 semanas pós-procedimento cirúrgico de facoemulsificação (M12), quatro animais de cada grupo foram eutanasiados, após anestesia com

⁵ Dopalen injetável – Vetbrands – Brasil.

⁶ Anasedan injetável – Vetbrands – Brasil.

⁷ Dimorf – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.

⁸ Anestalcon – Alcon laboratórios do Brasil Ltda.

⁹ Ioflex – Mediphacos – Brasil.

¹⁰ Maxican injetável 0,2% - Ouro Fino – Brasil.

¹¹ Tobrex – Alcon – Brasil.

¹² Pred fort – Allergan – Brasil.

¹³ Alphagan 0,2% - Allergan – Brasil.

acepromazina¹⁴ (1,5mg/Kg) associada à quetamina¹⁵ (20 mg/Kg) ambas por via IM, seguida pela administração intravenosa de tiopental (25 mg/kg) e de cloreto de potássio 19,1%¹⁶ (2 mL/Kg); em seguida, todos foram submetidos à enucleação do olho operado. Os demais coelhos de cada grupo (n=6) foram mantidos durante 24 semanas de pós-operatório (M=24), e então submetidos ao mesmo protocolo anteriormente descrito.

4.6 Análise macroscópica e histopatológica

Todos os bulbos oculares enucleados foram fixados em formol neutro tamponado 10%¹⁷ durante 48 horas; a seguir, a esclera foi incisada 300°, a aproximadamente 3 mm do limbo, utilizando-se bisturi crescente angulado e tesoura de ponta fina (figura 1). Após a localização da região da lente e com auxílio de uma pinça microcirúrgica e microscópio cirúrgico, os ligamentos suspensores foram rompidos em sua totalidade (360°) e as cápsulas da lente completamente removidas, com ou sem LIO (figuras 2 e 3) dependendo do grupo pertencente. Estas foram colocadas em uma placa de Petri e seccionadas ao meio; as LIOs quando presentes, foram juntamente incisadas, sendo retiradas posteriormente, obtendo-se duas metades do saco capsular. Os sacos capsulares foram macroscopicamente avaliados, quanto o seu aspecto e então foram incluídos em álcool 70%¹⁸ durante 12 horas, submetidos ao processo histológico para avaliação histomorfométrica e posterior avaliação imunohistoquímica.

¹⁴ Acepran 0,2% - Univet - Brasil

¹⁵ Dopalen – Vetbrands - Brasil

¹⁶ Cloreto de potássio 19,1% - Farmace – Brasil.

¹⁷ Formol 10% - Rioquímica – Brasil.

¹⁸ Álcool absoluto Zulu 99,3° INPM.



FIGURA 1: Imagem fotográfica do bulbo ocular sendo incisado na esclera.

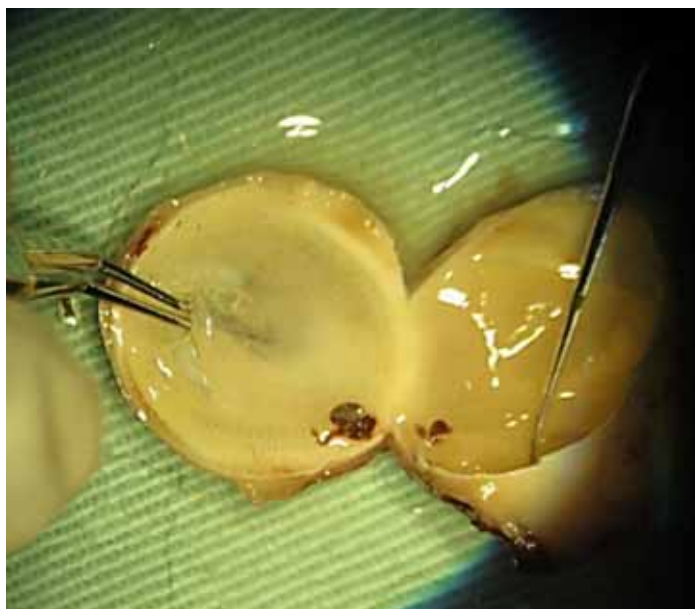


FIGURA 2: Imagem fotográfica do bulbo ocular do coelho do grupo Lente (GL). Observar a ruptura parcial dos ligamentos suspensores da lente, para a remoção do saco capsular.



FIGURA 3: Imagem fotográfica do bulbo ocular do grupo Lente (GL), após sua completa remoção. Notar a LIO posicionada entre as cápsulas anterior e posterior, bem como áreas de opacificação (setas).

4.7 Avaliação histomorfométrica

Após o processamento histológico padrão, os sacos capsulares foram incluídos em parafina, e então cortados em micrótomo rotativo. Foram realizados cortes axiais por microtomia (4 micrômetros); seis lâminas de cada olho foram confeccionadas, em média. Estas foram submetidas à coloração por hematoxilina e eosina (HE)¹⁹, bem como a imunomarcações.

Na coloração HE, foram analisadas as cápsulas anterior e posterior de cada animal, bem como sua celularidade total, utilizando-se microscópio Leica DMLD® com software de captura de imagens Leica Qwin Standard Versão 3.5.0; neste processo foram capturados e analisados 10 campos em aumentos de 5x e 40x.

Nas imagens capturadas foram mensuradas a distância entre cápsula anterior e posterior, espessuras das cápsulas anterior e posterior, e avaliada a morfologia celular presente nas mesmas. Foram utilizados escores de

¹⁹ Merck – Brasil.

classificação para celularidade, ou seja células epiteliais da lente, observadas na cápsula posterior e para o enrugamento na cápsula posterior, sendo (0) ausente, (1) leve, (2) moderada e (3) grave.

4.8 Avaliação da Imunohistoquímica

O processo de imunohistoquímica foi realizado no Laboratório de Experimentação de Produtos Naturais do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil. As amostras foram cortadas em micrótomo rotativo e colocadas em lâminas silanizadas e carregadas positivamente²⁰.

Os sacos capsulares foram submetidos à imunomarcção utilizando-se anticorpos Ki67, alfa-actina e vimentina (Quadro 1). As lâminas foram submetidas à desparafinização e hidratação; não foi necessária a realização de recuperação antigênica. Foram realizados os bloqueios para peroxidase endógena (H_2O_2 a 3%) e proteína inespecífica com 1% de BSA para incubação *overnight* com os respectivos anticorpos (Quadro 2).

Após a incubação com o anticorpo primário, as amostras foram processadas com o kit REVEAL Sistema de Detecção Livre de Biotina- Spring Biogen para revelação para peroxidase e contra-corado com hematoxilina. As amostras foram analisadas no microscópio Leica DMLD® acoplado com o software de captura de imagens Leica Qwin V3 Standard Versão 3.5.0. Foram capturadas 5 imagens de cada amostra imunomarcada, as quais foram submetidas à análise quantitativa no programa AVSoft BioView 4®.

²⁰ Amitel – Brasil.

QUADRO 1. Anticorpos, números de coelhos avaliados e momentos de avaliação

Anticorpo	Número de amostras		
	Total	M12	M24
Ki67	40	16	24
Vimentina	20	8	12
Alfa-actina	20	8	12

QUADRO 2. Anticorpos monoclonais e titulação utilizados.

Anticorpo	Titulação	Marca	Clone
Alfa-actina	1:50	Santa Cruz	CGA7
Ki67	1:100	Abcam	SP6
Vimentina	1:100	Ivintrogen	V9

4.9 Análise estatística

Técnica da análise de variância não paramétrica para o modelo com os dois fatores (grupos e momentos de avaliação) complementado com o teste de comparações múltiplas de Dunn (ZAR, 2009), considerando o nível de 5% de significância.

Resultados e Discussão

5. Resultados e Discussão

5.1 Avaliação macroscópica

Na avaliação macroscópica do saco capsular, no momento da coleta, observou-se maior fragilidade nos grupos GL e GPEG, três e duas amostras, respectivamente. Estes apresentavam-se mais finos e delicados quando comparados ao GC, os quais estavam firmes e opacos (n=10) (Figuras 4 e 5). Os sacos capsulares do GF e os demais sacos capsulares dos grupos GL e GPEG não apresentavam alterações macroscópicas.

Não foi observada nenhuma fragilidade das LIOs tratadas quando comparadas com as LIOs sem tratamento, todas as lentes intraoculares apresentavam-se normais quanto a sua estrutura. Nenhuma alteração significativa foi detectada nas superfícies das LIOs tratadas com polietilenoglicol, avaliadas *in vitro* (LIN et al., 2010).

No grupo GF foram verificadas poucas alterações macroscópicas; os sacos capsulares estavam íntegros, sem qualquer fragilidade e a maioria (n=6) apresentou áreas de opacidade (Figura 6).

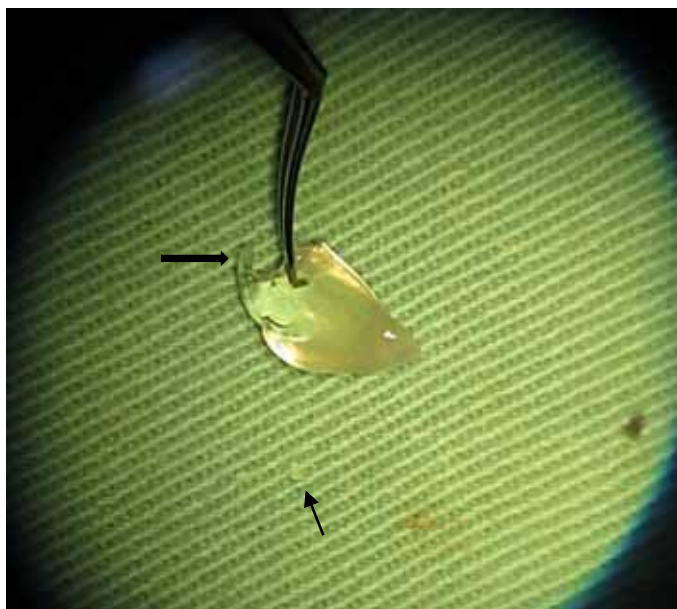


FIGURA 4. Imagem fotográfica do saco capsular do coelho do grupo Polietilenoglicol (GPEG). Notar a perda de material capsular (seta fina), com exposição da LIO (seta grossa).



FIGURA 5. Imagem fotográfica do saco capsular do coelho do grupo controle (GC).
Notar a transparência central e opacificação periférica.



FIGURA 6. Imagem fotográfica da lente do coelho grupo plasma de Flúor (GF).
Observar LIO e saco capsular íntegros e saco capsular discretamente opaco (seta).

5.2 Análise histomorfométrica

Na análise histomorfométrica foi observada a presença de uma membrana basal mais espessa na porção anterior, e mais fina na porção posterior, sendo

estas as cápsulas anterior e posterior; adicionalmente verificou-se células epiteliais cubóides na cápsula anterior, na região equatorial e na cápsula posterior (Figuras 7, 8 e 9), em todos os grupos avaliados. Avaliações similares às encontradas na literatura, pois observa-se em uma lente normal, independente da espécie avaliada, uma cápsula, que é a própria membrana basal do epitélio, de espessura não uniforme (BANKS, 1992; LAYFIELD, 2005); apresentando-se mais espessa no polo anterior e progressivamente mais fina no polo posterior (DEULLMANN, 1998; WILCOCK, 2007); ainda, associada a um epitélio lenticular cubóide na porção rostral, sendo este epitélio mais alongado no equador e ausente no polo caudal/posterior (BANKS, 1992; LAYFIELD, 2005). A diferença entre os grupos, neste trabalho, foi relacionada à quantidade de celularidade e/ou camadas de células presentes, seja na cápsula anterior ou na posterior.

Sabe-se que áreas de OCP não são homogêneas e seus efeitos visuais dependem da relação entre sua localização no eixo visual (BUEHL et al., 2005; JOSE et al., 2005); as análises deste estudo se deram principalmente na região do eixo visual, com enfoque especial à cápsula posterior, ou seja, aproximadamente 3 mm do eixo visual central, embora toda cápsula posterior tenha sido avaliada.

Foram observadas, quatro coelhos sem qualquer presença de celularidade na cápsula posterior no M12 (GL=1, GF=1 e GPEG=2) e cinco M24 (GL=3; GF=2), como são notadas nas Figuras 10 e 11. Todas esses coelhos foram submetidos ao implante LIO, e tal fato pode ser explicado pela associação do tratamento instituído nas LIOs, e principalmente pela própria presença da LIO, uma vez que ela pode exercer um efeito barreira (WEDJE et al., 2004), impedindo que as células epiteliais da lente dentro do saco capsular tenham sido expostas ao humor aquoso, que contém abundante fator transformador de crescimento β que é responsável pela transição epitelial-mesenquimal e pelo comportamento fibrótico das CELs (SHIRAI et al., 2004). Salienta-se ainda, que este efeito barreira impede o acesso de nutrientes e fatores de crescimento, resultando na regressão e atrofia destas células (HOLLICK et al., 1998).

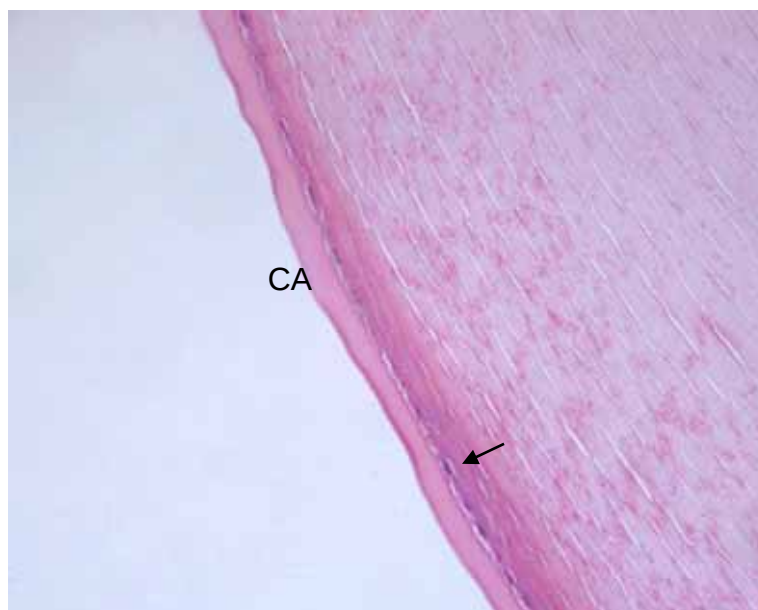


FIGURA 7. Fotomicrografia de corte histológico da cápsula anterior do coelho do grupo controle (GC) no M24 (HE, 40x). Notar a espessura normal da cápsula anterior (CA) e a presença normal de células epiteliais (seta).

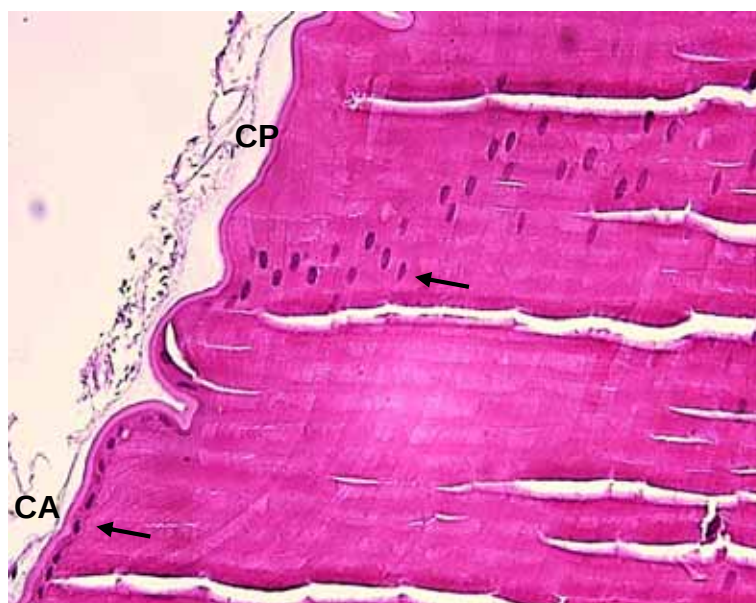


FIGURA 8. Fotomicrografia de corte histológico da região equatorial do coelho do grupo controle (GC) no M24 (HE, 40x). Notar cápsulas anterior (CA) e posterior (CP), e as células epiteliais (setas).



FIGURA 9. Fotomicrografia de corte histológico da cápsula posterior do coelho do grupo controle (GC) no M24 (HE, 40x). Notar a presença de inúmeras células epiteliais (setas).

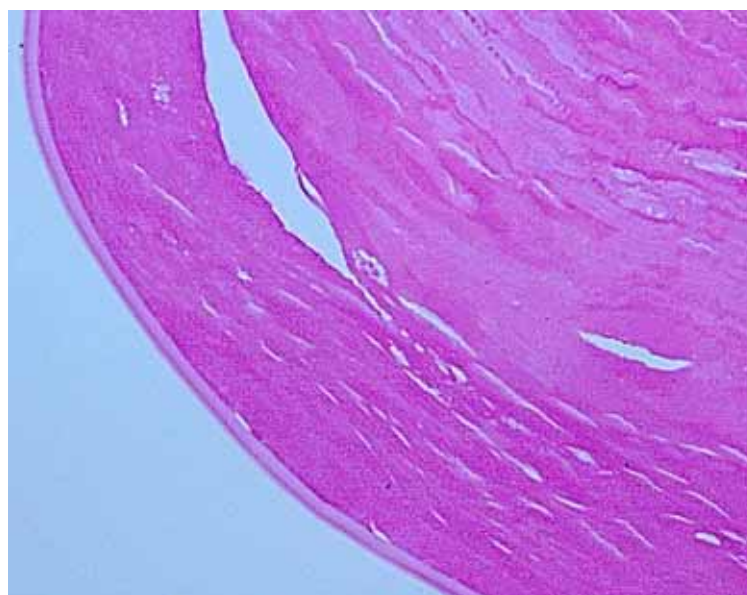


FIGURA 10. Fotomicrografia de corte histológico da cápsula posterior do coelho do grupo Polietilenoglicol (GPEG) no M12 (HE, 40x). Notar a ausência de celularidade.

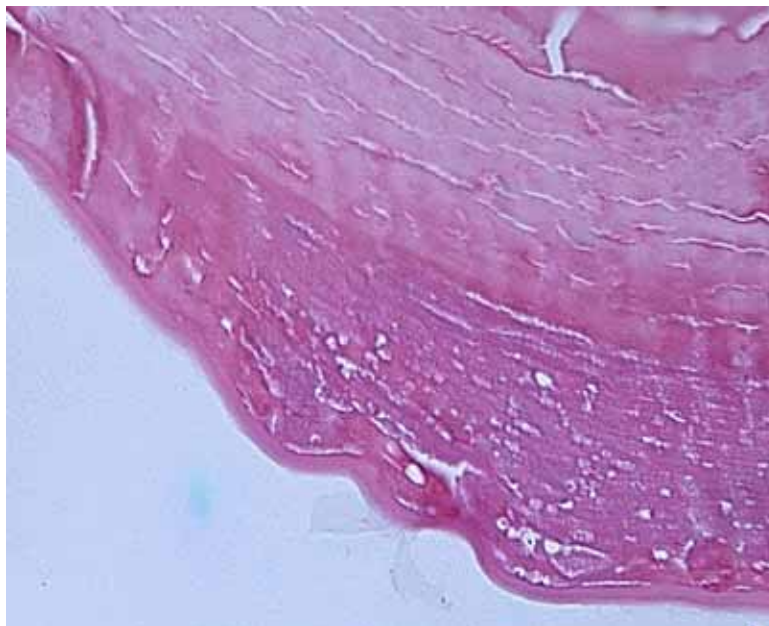


FIGURA 11. Fotomicrografia de corte histológico da cápsula posterior do coelho do grupo plasma de Flúor (GF) no M24 (HE, 40x). Notar a ausência de celularidade.

Saika et al. (1998) avaliaram histologicamente os fragmentos da cápsula, anterior e posterior, de três casos imediatamente após a facoemulsificação, e observaram uma monocamada de células epiteliais da lente na superfície interna da cápsula anterior, e ausência destas células na cápsula posterior, semelhante ao constatado neste estudo, sendo observada a presença de celularidade na cápsula anterior de todos os coelhos avaliados, apesar de 12 ou 24 semanas de pós-operatório. Ainda, relataram que as cápsulas periféricas de outros casos com LIO, por um período de 9 e 19 meses, apresentavam-se unidas, e células mononucleares, presumivelmente células epiteliais da lente, foram notadas entre as cápsulas da lente (SAIKA et al., 1998). Similar ao encontrado neste trabalho, pois 14 coelhos apresentaram as cápsulas anterior e posterior aderidas na região periférica com presença de células epiteliais, sendo cinco coelhos do GC, e três em cada dos demais grupos experimentais.

CELS migraram e foram verificadas na cápsulas posteriores de coelhos submetidos à facoemulsificação e colocação de LIO, avaliados até 7 semanas de pós-operatório, assim como foi observada ausência de CELs na cápsula posterior de um coelho avaliado (NISHI et al., 2007). Em um caso de OCP

infantil bilateral, oito meses após cirurgia de extração da catarata e implantação de LIO, observou-se, após processamento histológico e coloração utilizando HE, a presença de matriz extracelular (ECM) e de fibroblastos semelhantes a células lenticulares, sendo presumidamente células epiteliais da lente (SHIRAI et al., 2004). No presente estudo, observou-se a migração de células epiteliais nas cápsulas posteriores de coelhos avaliados em 12 e 24 semanas de pós-operatório.

Cápsulas anteriores e posteriores caninas, após cultivadas em meios contendo soro e meios livres de soro, foram avaliadas quanto a proliferação das CELs nas cápsulas, e observou-se que as células presentes nas cápsulas apresentavam a aparência cubóide (DAVIDSON et al., 2000); semelhante ao observado neste estudo, uma vez que as células encontradas nas cápsulas posteriores apresentavam morfologia cubóide, sendo portanto supostamente células epiteliais proliferadas.

Foram observadas, no presente estudo, um padrão de desenvolvimento da região cortical, ou seja, o recrescimento das fibras lenticulares em todas as lentes, não havendo diferenças entre os grupos avaliados. Alguns autores descrevem o depósito de colágeno e a regeneração das fibras lenticulares como parte da patogênese da OCP (AWASTHI et al., 2009; RAJ et al., 2009). Embora não tendo sido utilizada uma coloração específica para o colágeno, a presença do neocrescimento foi constatada na coloração HE, e foi possível evidenciar consideravelmente a regeneração das fibras lenticulares em todas as amostras dos diferentes grupos avaliados neste estudo; isto deve-se provavelmente a uma particularidade dos coelhos que apresentam um padrão de proliferação e regeneração considerável. Gwon et al. (1993) observaram, após a extração da lente de coelhos adultos, o desenvolvimento de grande recrescimento do córtex lenticular. Este recrescimento foi observado em três semanas de pós-operatório no grupo controle e seis semanas no grupo tratado. Além disso, após sete meses de pós-operatório, o preenchimento máximo do saco capsular da lente foi observado (GWON et al., 1993). No presente estudo, observou-se este recrescimento completo em 12 semanas de pós-operatório em todos os grupos avaliados.

A celularidade na cápsula posterior está apresentada na Tabela 1. Não houveram diferenças estatísticas entre os diferentes grupos de tratamento ou momentos de avaliação.

TABELA 1. Contagem de células totais na cápsula posterior segundo grupo e momentos de avaliação em semanas; mediana, valores mínimo e máximo.

	Grupo	Momento de Avaliação	
		M12	M24
Células totais	GL	1,0 (0,0; 2,0)	0,5 (0,0; 1,0)
	GF	1,5 (0,0; 2,0)	1,5 (0,0; 2,0)
	GPEG	1,0 (1,0; 2,0)	1,0 (1,0; 2,0)
	GC	2,5 (1,0; 3,0)	1,0 (1,0; 3,0)

Escores: 0 – ausente; 1 – leve; 2 – moderado; 3 – grave.

GL: grupo lente; GF: grupo plasma de Flúor; GPEG: grupo plasma de polietilenoglicol; GC: grupo controle.

No entanto, considerando apenas os escores de mediana e valores mínimos e máximos, observou-se menor celularidade nos GL e GPEG, nos dois momentos de avaliação, quando comparados aos demais grupos. O GL apresentou uma redução na celularidade, apesar de não significativa, quando comparados os dois momentos de avaliação. Em lentes caninas contendo LIO, cultivadas em meio contendo soro, notou-se a proliferação celular, como já citado anteriormente, no entanto a regressão de densidade celular, presumivelmente por morte celular, também foi verificada (DAVIDSON et al., 2000).

Na avaliação da espessura da cápsula posterior (Tabela 2), no M12, os GL e GPEG apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em suas espessura quando comparados ao GC (Tabela 2). Em valores numéricos, o GPEG apresentou a menor espessura da cápsula posterior da lente no M12; no entanto GPEG apresentou uma elevação significativa em sua espessura nos diferentes

momentos de avaliação. No M24, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, e o menor valor numérico observado foi no GL.

Devido a uma série de avanços, a ocorrência de OCP diminuiu ou pelo menos o seu início foi adiado (SINHA et al., 2013); e com exceção da menor espessura verificada nos GL e GPEG, nos demais tratamentos não foram observados retardo ou diminuição das alterações relacionadas à OCP e descritas por Sinha et al. (2013); diferente de Werner et al. (2004) e Awasthi et al. (2009), que sugerem que as diversas técnicas existentes, com diferentes graus de sucesso, tendem a diminuir a OCP; neste estudo, no M24, a utilização do tratamento à base de plasma de polietilenoglicol e Flúor, não se verificou redução ou diminuição da OCP.

A espessura da cápsula posterior e a presença de celularidade estão diretamente relacionadas, uma vez que a análise quantitativa da espessura, neste estudo, foi considerando-se a presença ou não deste epitélio.

TABELA 2. Espessura média da cápsula posterior (espessura CP) em μm , segundo grupo e momentos de avaliação em semanas; mediana, valores mínimo e máximo.

	Grupo	Momento de Avaliação	
		M12	M24
Espessura de CP	GL	6,25 (3,99; 10,32) *	6,96 (5,77; 17,89)
	GF	7,91 (6,90; 9,58)	8,15 (6,33; 11,08)
	GPEG	5,80 (5,20; 6,47) ∞ +	11,74 (7,71; 19,31) +
	GC	11,44 (8,27; 21,06) * ∞	8,02 (7,04; 13,45)

Legenda: *, ∞ : comparação entre grupos, fixado o momento, sendo $p < 0,05$.

+ : comparação entre os momentos, fixado o grupo, sendo $p < 0,05$.

GL: grupo lento; GF: grupo plasma de Flúor; GPEG: grupo plasma de polietilenoglicol; GC: grupo controle.

Coelhos que receberam LIO tratadas com plasma de Flúor apresentaram OCP maior no M12 quando comparadas aos coelhos que receberam LIO tratada com polietilenoglicol (SERENO, 2012). Além disso, não foram observadas evidências na redução da OCP, na fase inicial, nos coelhos com LIO tratada

com plasma de Flúor em relação aos demais tratamentos (SERENO, 2012). No presente estudo, de modo similar, os maiores valores de espessura também foram observados no GF, apesar de não significativo.

O tratamento de superfícies de LIOs acrílicas a partir da polimerização por plasma de polietilenoglicol reduziu inicialmente o desenvolvimento e a intensidade da OCP após facoemulsificação (SERENO, 2012). Em um estudo, usando lentes de acrílico com superfície modificada com PEG, observou-se formação de OCP, embora significativamente menor durante a terceira a sexta semanas no grupo LIO tratada com polietilenoglicol (LEE et al., 2007). Neste estudo histológico, pode-se notar o menor valor da espessura no GPEG, e significativo em relação ao GC, indicando uma possível ação inibitória na fase inicial. Desta forma, os dados obtidos no presente estudo, corroboram Lee et al. (2007), Sereno (2012), os quais concluíram que a modificação da superfície da LIO de acrílico com PEG pode reduzir a formação de OCP durante a fase precoce. Novos estudos ainda são necessários para avaliar as possíveis e potenciais complicações do uso de fármacos de liberação lenta, como ciclosporina A, inibidores de metaloproteinases, mitomicina C, rapamicina (LIU et al., 2013); talvez a utilização do PEG, com microesferas de liberação lenta, poderia trazer benefícios no retardo do desenvolvimento da OCP, uma vez que ele mostra-se eficaz no controle da OCP numa fase precoce.

Na avaliação clínica de coelhos submetidos à facoemulsificação e implante de LIO com superfície modificada com plasma de polietilenoglicol e Flúor, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais quanto aos sinais clínicos como blefarospasmo, fotofobia, secreção ocular, opacidade corneal, pressão intraocular, dentre outras (SERENO, 2012) indicando que os fármacos, o Flúor e polietilenoglicol, podem ser seguramente utilizados como adjuvante na prevenção da OCP.

No entanto, considerando-se a OCP, durante as avaliações finais, não foram encontradas diferenças significativas (LEE et al., 2007; SERENO, 2012). Este mesmo comportamento foi verificado na fase mais tardia, ou seja, sem diferenças entre os grupos avaliados, possivelmente pela ausência de ação inibitória do polietilenoglicol, indicando que o uso da tecnologia de plasma não

impediu a longo prazo a proliferação celular (SERENO, 2012). Salienta-se que o coelho apresenta uma taxa de proliferação muito intensa, não somente no bulbo ocular mas em diversos órgãos e que a avaliação de seis a oito semanas de pós-operatório, corresponderia a aproximadamente dois anos em humanos (WERNER et al., 2004). Neste experimento, o período final de 24 semanas corresponderia portanto, a um prazo maior em anos, desta forma o efeito do plasma de PEG ou demais tratamentos não foram efetivos.

A adesão celular em ensaios *in vitro* demonstra que as lentes intraoculares modificadas com PEG, não só reduz significativamente a adesão de plaquetas, macrófagos e CELs, mas também tende a adiar a difusão e crescimento destas células, o que indica que as lentes intraoculares modificadas apresentaram boa biocompatibilidade uveal e melhor biocompatibilidade capsular (LIN et al., 2010). Indicativos deste efeito na fase inicial foram verificados neste estudo, entretanto a sua duração foi observada apenas na fase inicial de avaliação (M12), mesmo utilizando-se a tecnologia de plasma de PEG.

Na avaliação da presença de enrugamento na cápsula posterior não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos ou momentos de avaliação (Tabela 3), embora a presença de enrugamento capsular posterior tenha sido observado em todos os grupos (Figuras 12 e 13), diferindo apenas na intensidade. O GC apresentou valores de escore mais elevado nos dois momentos em relação aos demais grupos, porém não significativo. Por outro lado, o GPEG apresentou os menores escores no M12, sendo que em algumas lentes, em relação aos demais grupos, não apresentaram enrugamento na cápsula posterior (escore 0) (Tabela 3).

TABELA 3. Enrugamento da cápsula posterior segundo grupo e momentos de avaliação em semanas; mediana, valores mínimo e máximo.

	Grupo	Momento de Avaliação	
		M12	M24
Enrugamento	GL	1,0 (1,0; 2,0)	1,0 (0,0; 1,0)
	GF	1,5 (1,0; 3,0)	0,5 (0,0; 2,0)
	GPEG	1,0 (0,0; 2,0)	1,0 (1,0; 3,0)
	GC	2,0 (1,0; 2,0)	2,0 (1,0; 3,0)

Escores: 0 – ausente; 1 – leve; 2 – moderado; 3 – grave.

GL: grupo lente; GF: grupo plasma de Flúor; GPEG: grupo plasma de polietilenoglicol; GC: grupo controle.

Saxby et al. (1998) cultivaram cápsulas anteriores e posteriores da lente bovinas e humanas, por 12 semanas. Os autores relataram o crescimento de células epiteliais na cápsula posterior em diferentes meios, com ou sem soro fetal, anteriormente livre deste epitélio. Nas duas espécies, a presença de multicamadas foi sempre maior com o meio contendo soro, atingindo o máximo de 5 e 12 camadas de células nas cápsulas humana e bovina, respectivamente. Saxby et al. (1998) não observaram celularidade na superfície externa da cápsula posterior. Neste estudo, também não foram observadas células epiteliais da lente na superfície externa da cápsula posterior, em nenhum coelho dos quatro grupos avaliados.

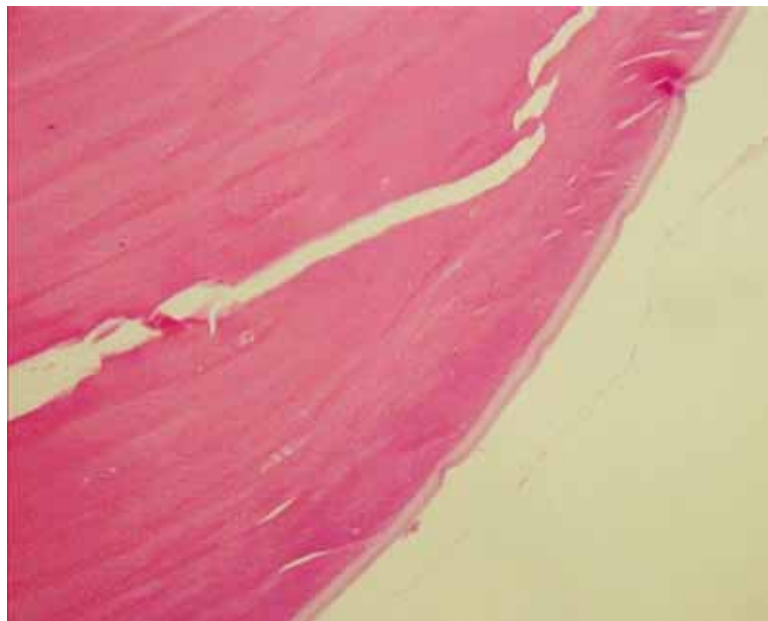


FIGURA 12. Fotomicrografia de corte histológico do coelho do grupo Polietilenoglicol (GPEG) no M24 (HE, 40x). Observar enrugamento capsular escore 1.



FIGURA 13. Fotomicrografia de corte histológico do coelho do grupo controle (GC) no M24 (HE, 40x). Observar enrugamento capsular posterior escore 3.

Além disso, foram constatadas multicamadas na cápsula posterior, sendo em média três camadas de células epiteliais em três cápsulas posteriores do GC. Os GPEG, GF e GL apresentaram em média uma camada de células epiteliais na cápsula posterior.

Nas cápsulas posteriores caninas cultivadas por período superior a 14 dias, foram descritos o desenvolvimento de agregados celulares e rugas, sendo estes os locais de dispersão da luz (DAVIDSON et al., 2000). Wong et al. (2004), após cultura de cápsulas posteriores de lentes humanas coletadas para avaliação quanto ao desenvolvimento de OCP, também observaram, no décimo dia de avaliação, a presença evidente de uma camada de células epiteliais na cápsula posterior, bem como a presença de rugas. Esses enrugamentos descritos são portanto similares aos observados em todos os grupos deste estudo.

Na análise histopatológica de cápsulas de lentes humanas para avaliação da síndrome de contração capsular, não foram observadas estruturas vasculares nas cápsulas da lente (REYES et al., 1999), semelhante ao verificado neste estudo histopatológico.

Foram observadas a presença de vacuolizações (Figuras 14 e 15) no material lenticular observado no saco capsular em todos os grupos, sendo verificado em maior número geral, por ordem decrescente, no grupo GF (80%), GPEG (66,66%), no GL (50%), GC (25%). Fernandez et al. (2004) também observaram, na análise histológica, a formação de vacuolização nos diferentes tratamentos instituídos para LIOs, ou seja, hialuronato de sódio (SHA), Mitomicina C (MMC) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Segundo os autores, essas vacuolizações representam CELs mortas, necróticas, bem como a proliferação de outras CELs ao redor. Estes descrevem ainda, que o grau de vacuolização está relacionado com o grau de desorganização do crescimento da células da lente. E ainda que, o aumento da presença de vacuolização nos olhos tratados com MMC e nos olhos tratados com EDTA é explicado pelo fato que esses fármacos afetaram a proliferação das CELs de forma mais eficiente do que a água destilada, por exemplo. No presente estudo, os maiores índices de vacuolização foram notados também nos grupos de LIO tratados com

polietilenoglicol e flúor, e principalmente no M12, sugerindo uma atuação dos fármacos utilizados no tratamento de superfície.

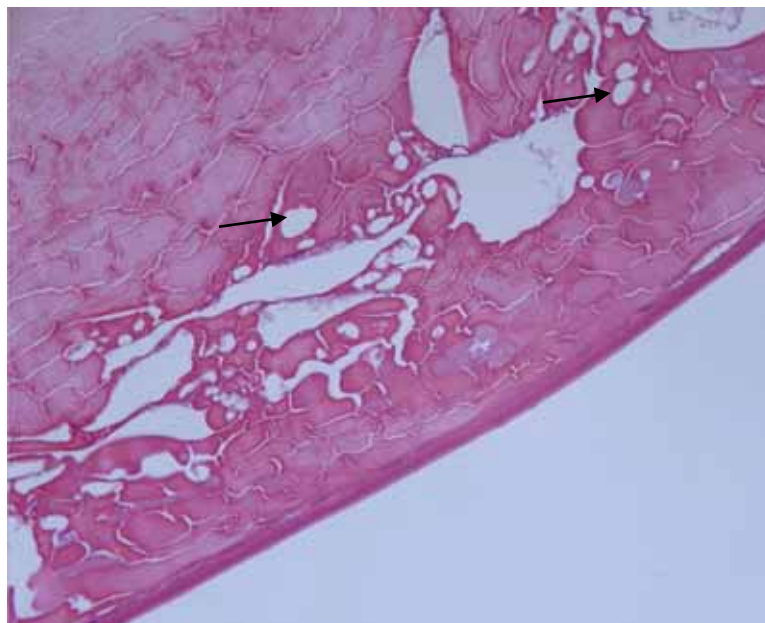


FIGURA 14. Fotomicrografia de corte histológico do coelho do grupo plasma de Flúor (GF) (HE, 40x). Observar a presença de vacuolização presente (setas).

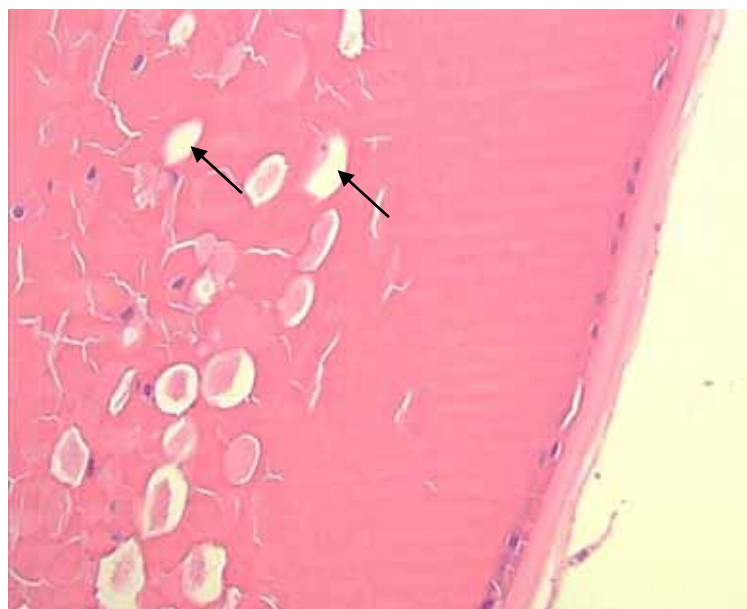


FIGURA 15. Fotomicrografia de corte histológico do coelho do grupo Polietilenoglicol (GPEG) (HE, 40x). Notar a vacuolização presente (setas).

Na avaliação da distância entre as cápsulas anterior e posterior, os grupos e momentos apresentaram-se de forma similar, não havendo diferenças estatísticas. Considerando os valores numéricos, o GPEG apresentou a menor distância nos dois momentos (Tabela 4).

TABELA 4. Distância média entre cápsulas anterior e posterior (distância AP) em μm , segundo grupo e momentos de avaliação em semanas; mediana, valores mínimo e máximo.

	Grupo	Momento de Avaliação	
		M12	M24
Distância AP	GL	1416,48 (529,33; 1756,16)	1175,93 (357,92; 2338,12)
	GF	1223,20 (740,89; 1703,19)	1346,26 (1002,05; 1774,54)
	GPEG	948,57 (910,28; 1315,45)	820,95 (179,00; 2304,66)
	GC	1244,68 (799,95; 1877,28)	1411,15 (822,34; 16683,63)

GL: grupo lento; GF: grupo plasma de Flúor; GPEG: grupo plasma de polietilenoglicol; GC: grupo controle.

A avaliação da espessura da cápsula anterior apresentada na Tabela 5, evidencia espessura similar nos diferentes grupos e momentos avaliados, não apresentando diferença estatística para esta análise.

TABELA 5. Espessura média da cápsula anterior (espessura CA) em μm , segundo grupo e momentos de avaliação em semanas; mediana, valores mínimo e máximo.

	Grupo	Momento de Avaliação	
		M12	M24
Espessura CA	GL	17,91 (13,72; 22,58)	16,88 (10,61; 88,76)
	GF	19,61 (15,19; 25,41)	24,72 (9,58; 29,20)
	GPEG	12,58 (11,22; 17,43)	30,97 (10,05; 63,14)
	GC	15,32 (12,55; 33,50)	17,50 (12,74; 41,02)

GL: grupo lento; GF: grupo plasma de Flúor; GPEG: grupo plasma de polietilenoglicol; GC: grupo controle.

5.3 Imunohistoquímica

5.3.1 Alfa-actina

As CELs A são positivas para alfa-actina e, promovem a contração e enrugamento da cápsula posterior (WORMSTONE, 2002; WORMSTONE et al., 2009). Segundo Davidson et al. (2000), cápsulas caninas cultivadas exibiam positividade para alfa-actina, e esta expressão foi vista predominantemente em associação com rugas capsulares. Neste estudo, o marcador alfa-actina foi evidenciado na cápsula posterior dos grupos experimentais (Figuras 16 e 17), porém não houve diferença significativa entre os momentos de avaliação, nem entre os grupos avaliados (Tabelas 6 e 7). Considerando-se valores percentuais de células imunomarcadas positivamente, o GC apresentou o maior percentual nos dois momentos de avaliação, porém sem diferença significativa. Em paralelo com o enrugamento na cápsula posterior, observou-se que a maioria das cápsulas posteriores positivas para a imunomarcagem de alfa-actina também apresentavam enrugamento nos cortes histológicos, corroborando o descrito por Davidson et al. (2000), Wormstone (2002) e Wormstone et al. (2009).

Saika et al. (1998) observaram que as células epiteliais da lente em proliferação na superfície interna das cápsulas anterior e posterior ao redor das lentes intraoculares implantadas nos sete casos avaliados, após 19 meses de pós-operatório, foram imunomarcadas para alfa-actina; semelhante ao presente estudo, em que foram observadas células imunomarcadas para alfa-actina na cápsula anterior, posterior e região equatorial do saco capsular, num período de 6 meses de avaliação

A porcentagem média de imunomarcagem, neste estudo foi de 50% no GL e GF e de 100% no GPEG e GC no M12; no M24 este percentual se manteve no GC, mas reduziu nos grupos com implante de LIO. A expressão numérica da marcação para alfa-actina foi elevada nos GL, GPEG e GC, no M24, pois apresentaram, respectivamente 42%, 44% e 47% de células marcadas em relação ao total de células presentes na cápsula posterior. Enquanto, no GF está expressão foi baixa, pois apresentou percentual zero de células imunomarcadas em relação ao total de células presentes na cápsula posterior. Saika et al. (1998)

observaram expressão elevada de alfa-actina em células epiteliais da lente em proliferação, acumulada na superfície interna do saco capsular. Assim, a presença de positividade de expressão, foi alta no presente estudo, apesar do número de células positivas não o ser. No presente estudo, os tratamentos instituídos para as LIOs promoveram redução nesta marcação, nos períodos avaliados.

Células epiteliais da lente de cápsulas posteriores humana e bovina foram positivas para alfa-actina nas cápsulas cultivadas (SAXBY et al., 1998). Além disso, o alfa-actina é considerado um marcador importante para células contráteis, e tal observação pode explicar a contração e enrugamento da cápsula posterior (NAGAMOTO et al., 1997; SAXBY et al., 1998). O enrugamento descrito também foi observado neste estudo, independente do grupo experimental, corroborando com os achados destes autores.

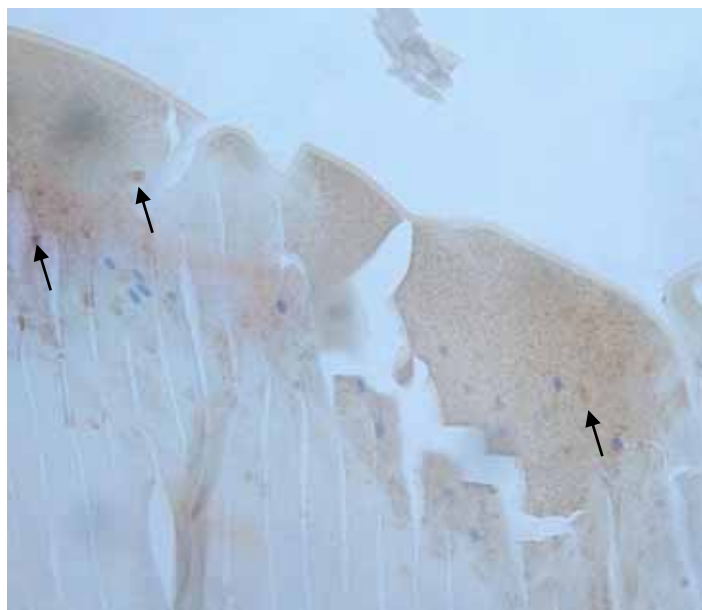


FIGURA 16. Imunomarcção alfa-actina na cápsula posterior do coelho do grupo Polietilenoglicol (GPEG) (40x). Notar presença de células epiteliais com núcleo imunomarcado (setas).



FIGURA 17. Imunomarcção alfa-actina n cápsula posterior do coelho do grupo controle (GC) (40x). Notar presença de células epiteliais com núcleo imunomarcado (setas).

TABELA 6. Quantidade de células imunomarcadas com alfa-actina, segundo grupo e momentos (M) de avaliação em semanas; mediana, valores mínimo e máximo.

	Grupo	Momento de Avaliação	
		M12	M24
Quantidade de células (alfa-actina)	GL	2,5 (0,0; 5,0)	0,0 (0,0; 0,0)
	GF	3,5 (0,0; 7,0)	0,0 (0,0; 0,0)
	GPEG	2,5 (1,0; 4,0)	3,0 (0,0; 4,0)
	GC	3,0 (1,0; 5,0)	3,0 (2,0; 5,0)

GL: grupo lente; GF: grupo plasma de Flúor; GPEG: grupo plasma de polietilenoglicol; GC: grupo controle.

TABELA 7. Imunomarcção alfa-actina segundo grupo e momentos de avaliação em semanas, distribuição numérica e percentual (%).

Grupo	Momento	Marcação Alfa-actina		Total
		Negativo	Positivo	
GL	M12	1 (50,00)	1 (50,00)	2
	M24	2 (66,67)	1 (33,33)	3
GF	M12	1 (50,00)	1 (50,00)	2
	M24	3 (100,00)	0 (00,00)	3
GPEG	M12	0 (00,00)	2 (100,00)	2
	M24	1 (33,33)	2 (66,67)	3
GC	M12	0 (00,00)	2 (100,00)	2
	M24	0 (00,00)	3 (100,00)	3

GL: grupo lento; GF: grupo plasma de Flúor; GPEG: grupo plasma de polietilenoglicol; GC: grupo controle.

5.3.2 Ki67

O Ki67 é um importante marcador de proliferação celular, sendo expresso em todas as fases do ciclo celular G1, S, G2, no entanto células quiescentes ou na fase G0 não o expressam (GERDES et al., 1983; GERDES et al., 1984; HALL; LEVISON, 1990). A imunomarcção celular para o marcador Ki67 na cápsula posterior foi evidenciada em todos os grupos avaliados (Figuras 18, 19 e 20), porém não foi evidenciada diferença significativa entre os grupos experimentais. Apenas no GL verificou-se uma redução significativa no M12 em relação ao M24, provavelmente devido a maior evidência numérica de proliferação celular no M12, neste grupo experimental (Tabelas 18 e 19).

Foram observadas células epiteliais na cápsula posterior nos cortes histológicos, embora algumas amostras tenham sido negativas para este marcador, indicando que estas células não estavam em proliferação, corroborando ao descrito Gerdes et al. (1983); Gerdes et al. (1984); Hall e Levison (1990). E ainda, segundo Nishi et al. (2007), células epiteliais da lente foram observadas na cápsula posterior, embora a grande maioria dos núcleos

foram negativos para Ki67, concluindo que estas células estavam na fase G0 do ciclo celular, indicando ausência proliferativa.

Nishi et al. (2007) observaram CELs na curvatura da cápsula (região periférica), e que estas apresentaram núcleos positivos para Ki67, indicando que estavam em proliferação. Resultados de imunolocalização com Ki67 em olhos humanos *post mortem*, submetidos anteriormente a extração da catarata e colocação de LIO, mostraram núcleos positivos na cápsula posterior e na região equatorial, e também foram encontrados ocasionalmente na cápsula anterior (RAKIC et al., 2000). No presente estudo, também foram encontradas células positivas para o marcador Ki67 na cápsula anterior e na região equatorial em todos os grupos experimentais.

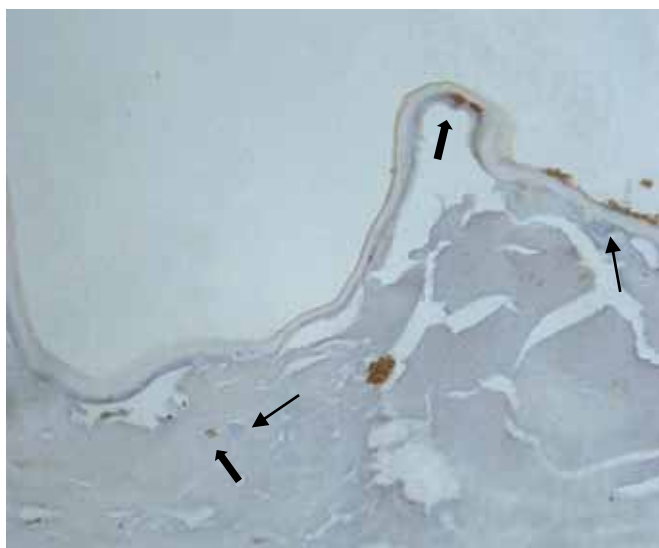


FIGURA 18: Imunomarcção para Ki67 nas cápsula posterior do coelho do grupo Polietilenoglicol (GPEG) (40x). Notar núcleo corado - setas. Notar presença de células epiteliais com núcleo não imunomarcado (seta fina) e células com núcleo imunomarcado (seta grossa).

No M12, os grupos com LIO tratadas apresentaram o maior percentual de células negativas para o anticorpo Ki67 quando comparado com o grupo LIO sem tratamento (Tabela 9), mostrando eficácia do tratamento no controle da proliferação celular. Ainda, a maioria dos grupos apresentaram o maior percentual de células negativas para o anticorpo Ki67 no M24, porém sem

diferença significativa (Tabela 9), denotando uma redução natural na proliferação celular com a evolução do processo

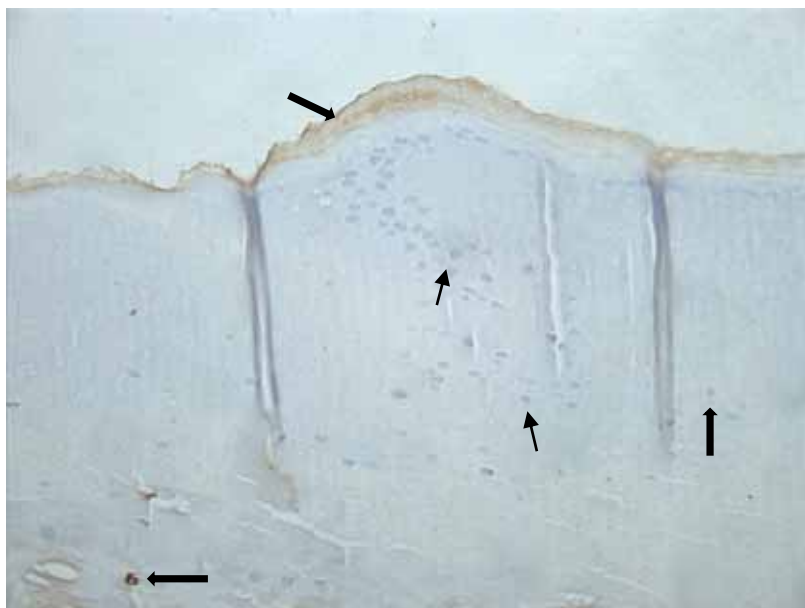


FIGURA 19: Imunomarcção para Ki67 na região equatorial do coelho do grupo Polietilenoglicol (GPEG) (40x). Notar presença de células epiteliais com núcleo não imunomarcado (seta fina) e células com núcleo imunomarcado (seta grossa).

A expressão numérica da marcação para Ki67 foi elevada nos GL, GPEG e GC, no M12, pois apresentaram, respectivamente 40%, 56% e 56% de células marcadas em relação ao total de células presentes na cápsula posterior. Enquanto, no GF esta expressão foi baixa, pois apresentou 14% de células imunomarcadas em relação ao total de células presentes na cápsula posterior. Já na avaliação final (M24), essa expressão foi reduzida nos GL, GPEG e GC, tendo sido observado 11%, 6% e 11%, respectivamente, enquanto no GF, a expressão numérica da imunomarcção foi de 37%.

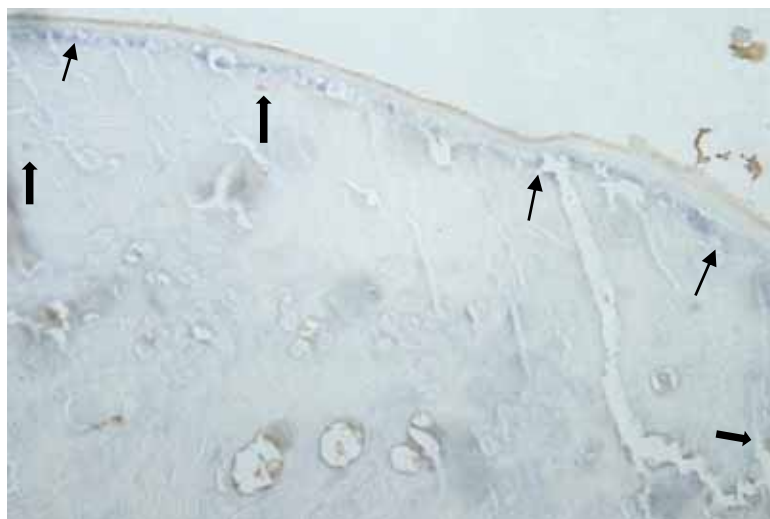


FIGURA 20: Imunomarcção para Ki67 na cápsula anterior do coelho do grupo Polietilenoglicol (GPEG) (40x). Notar presença de células epiteliais com núcleo não imunomarcado (seta fina) e células com núcleo imunomarcado (seta grossa).

TABELA 8. Quantidade de células imunomarcadas com Ki67 na cápsula posterior, segundo grupo e momentos de avaliação em semanas; mediana, valores mínimo e máximo.

	Grupo	Momento de Avaliação	
		M12	M24
Quantidade de células (Ki67)	GL	2,5 (2,0; 3,0) *	0,0 (0,0; 2,0) *
	GF	0,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 7,0)
	GPEG	0,0 (0,0; 13,0)	0,0 (0,0; 1,0)
	GC	1,0 (0,0; 4,0)	0,0 (0,0; 3,0)

*comparação entre momentos, fixado o grupo, sendo $p < 0,05$.

GL: grupo lente; GF: grupo plasma de Flúor; GPEG: grupo plasma de polietilenoglicol; GC: grupo controle.

5.3.3 Vimentina

A vimentina foi positiva em todos os grupos (Figuras 21 e 22), e a similitude dos outros marcadores, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e momentos (Tabelas 10 e 11).

TABELA 9. Imunomarcção Ki67 na cápsula posterior segundo grupo e momentos de avaliação em semanas; distribuição numérica e percentual (%).

Grupo	Momento	Marcação Ki67		Total
		Negativa	Positiva	
GL	M12	0 (0,00)	4 (100,00)	4
	M24	5 (83,33)	1 (16,67)	6
GF	M12	3 (75,00)	1 (25,00)	4
	M24	4 (66,67)	2 (33,33)	6
GPEG	M12	2 (66,67)	1 (33,33)	3
	M24	5 (83,33)	1 (16,67)	6
GC	M12	3 (50,00)	3 (50,00)	6
	M24	4 (66,67)	2 (33,33)	6

GL: grupo lente; GF: grupo plasma de Flúor; GPEG: grupo plasma de polietilenoglicol; GC: grupo controle.

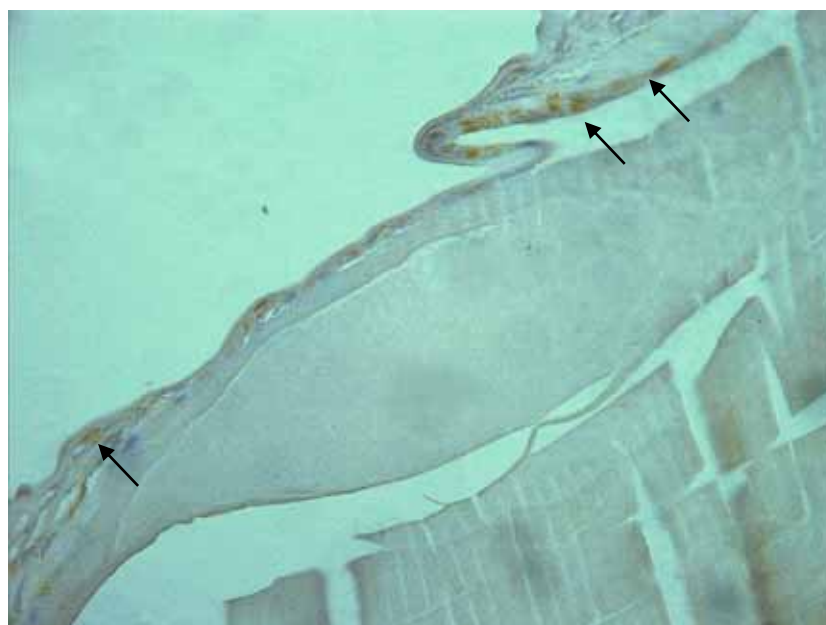


FIGURA 21: Imunomarcção para vimentina nas cápsula posterior do coelho do grupo Controle (GC) (40x). Notar células epiteliais com núcleo imunomarcado (setas).

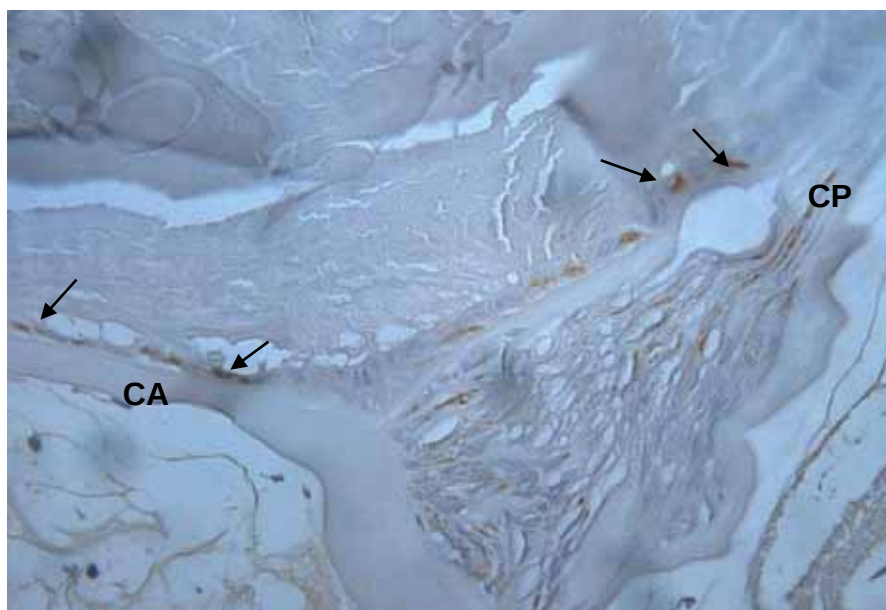


FIGURA 22: Imunomarcção para vimentina nas cápsula anterior (CA), região equatorial e cápsula posterior (CP) do coelho do grupo Lente sem tratamento (GL) (40x). Notar células epiteliais com núcleo imunomarcado (setas).

TABELA 10. Quantidade de células imunomarcadas com vimentina, na cápsula posterior, segundo grupo e momentos de avaliação em semanas; mediana, valores mínimo e máximo.

	Grupo	Momento de Avaliação	
		M12	M24
Quantidade de células (Vimentina)	GL	10,0 (3,0; 17,0)	1,0 (0,0; 4,0)
	GF	1,5 (0,0; 3,0)	0,0 (0,0; 3,0)
	GPEG	3,5 (3,0; 4,0)	0,0 (0,0; 2,0)
	GC	13,5 (6,0; 21,0)	5,0 (4,0; 13,0)

GL: grupo lente; GF: grupo plasma de Flúor; GPEG: grupo plasma de polietilenoglicol; GC: grupo controle.

Shirai et al. (2004) analisaram uma cápsula posterior humana, após procedimento de capsulotomia posterior e Davidson et al. (2000) avaliaram amostras de lentes caninas cultivadas, ambos observaram, na análise

imunohistoquímica, células positivas para os marcadores vimentina e alfa-actina, dados semelhante aos encontrados neste estudo.

TABELA 11. Imunomarcação de vimentina segundo grupo e momentos de avaliação em semanas; distribuição numérica e percentual (%).

Grupo	Momento	Marcação Vimentina		Total
		Negativa	Positiva	
GL	M12	0 (0,00)	2 (100,00)	2
	M24	1 (33,33)	2 (66,67)	3
GF	M12	1 (50,00)	1 (50,00)	2
	M24	2 (66,67)	1 (33,33)	3
GPEG	M12	0 (66,67)	2 (100,00)	2
	M24	2 (66,67)	1 (33,33)	3
GC	M12	0 (00,00)	2 (100,00)	2
	M24	0 (00,00)	3 (100,00)	3

GL: grupo lente; GF: grupo plasma de Flúor; GPEG: grupo plasma de polietilenoglicol; GC: grupo controle.

Observou-se a presença de irregularidades e rugas na cápsula posterior da lente, além de células fusiformes com características de células miofibroblásticas, indicando ser células epiteliais remanescentes da lente que sofreram transformação epitélio-mesenquimal (SHIRAI et al., 2004). E ainda, na imunohistoquímica, células epiteliais de cápsulas posteriores foram positivas para vimentina e alfa-actina, confirmando caráter miofibroblástico, sendo estas as células epiteliais da lente que sofreram transformação epitélio-mesenquimal (REYS et al., 1999), o mesmo observado no trabalho em questão. A porcentagem da positividade da vimentina também foi alta, e sem diferença entre os grupos, sugerindo a transformação descrita, e de modo similar, sem diferença entre os grupos tratados.

Sabe-se que a vimentina é expressa na maioria das células de origem mesenquimal, incluindo os fibroblastos (LAZARIDES, 1982; COCHARD; PAULIN 1984; POLAK; NOORDEN, 1986; EVANS, 1998; SAIKA et al., 1998), assim a análise imunohistoquímica deste estudo sugere que as células positivas

para a vimentina são as células epiteliais da lente remanescentes que sofreram transformação epitelio-mesenquimal, sendo portanto, células epiteliais do tipo A (CELS-A). Enquanto as células epiteliais do tipo “E (CELS-E) por apresentarem uma taxa mitótica alta, dando origem a novas fibras continuamente durante a vida (PANDEY et al., 2004), possivelmente tenham sido as células positivas para o marcador Ki67, de proliferação celular. A expressão numérica da marcação para vimentina foi elevada nos GL, GPEG e GC, nos dois momentos de avaliação, pois apresentaram mais de 30% de células imunomarcadas em relação ao total de células presentes na cápsula posterior. No M12, foi observado nos GL, GPEG e GC, respectivamente 76%, 77% e 45%; já no M24, esses valores foram, respectivamente, 50%, 50% e 88% de células marcadas em relação ao total de células presentes na cápsula posterior. Enquanto, no GF está expressão foi baixa, pois o apresentou 11% de células imunomarcadas em relação ao total de células presentes na cápsula posterior, no M12 e no M24 foi de 17%.

A distribuição das células positivas para vimentina foi uniforme, e estavam dispostas ao longo da população de células, independentemente da localização na cápsula, enquanto que a expressão para o alfa-actina foi observada mais evidentemente no saco capsular e em células dentro e adjacentes as pregas e rugas na cápsula posterior (DAVIDSON et al., 2000). Os achados do presente estudo corroboram aos achados em cães, uma vez que as células positivas para vimentina distribuíam-se entre as células epiteliais presentes, tanto na cápsula posterior quanto na cápsula anterior e região equatorial, enquanto as células positivas para alfa-actina, quando presentes, localizavam-se principalmente entre as rugas capsular posterior.

Conclusão

6. Conclusão

Com base no estudo conclui-se que o tratamento de lentes intraoculares com plasma de polietilenoglicol e Flúor pode ser realizado como adjuvante na prevenção da opacidade de cápsula posterior, pois não causa alterações na morfologia da lente após a facoemulsificação.

Implante de LIO tratada com plasma de polietilenoglicol ou LIO comercial promovem menor espessura da cápsula posterior com relação à ausência do implante.

Considerando-se as demais variáveis estudadas e avaliação até seis meses, os tratamentos da superfície da LIO à base de plasma de flúor e polietilenoglicol não reduziram o desenvolvimento das alterações histológicas associadas à opacidade de cápsula posterior.

Avanços nos processos de tratamento da superfície da LIO com plasma e polimerização de polietilenoglicol devem ser estimulados, objetivando o aumento da permanência do polietilenoglicol no implante.

Referências bibliográficas

7. Referências bibliográficas

ABELA-FORMANEK, C.; AMOM, M.; SCHILD, G.; SCHAUERSBERGER, J.; HEINZE, G.; KRUGER, A. Uveal and capsular biocompatibility of hydrophilic acrylic, hydrophobic acrylic, and silicone intraocular lenses. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.28, p.50-61, 2002a.

ABELA-FORMANEK, C.; AMON, M.; SCHAUERBERGER, J.; KRUGER, A. NEPP, J.; SCHILD, G. Results of hydrophilic acrylic, hydrophobic acrylic, and silicone intraocular lenses in uveitic eyes with cataract: Comparison to a control group. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.28, p.1141-1152, 2002b.

ADKINS, E.A.; HENDRIX, D.V.H. Cataract Evaluation and Treatment in Dogs. *Compendium and Veterinary Technician*, v.25, p.812-825, 2003. Disponível em: <http://www.vetlearn.com> Acesso em 28 jan.2012.

APPLE, D.J.; SOLOMON, K.D.; TETZ, M.R.; ASSIA, E.I.; HOLLAND, E.Y.; LEGLER, U.F. Posterior capsule opacification. *Survey of Ophthalmology*, v.37, p. 73-116, 1992.

APPLE, D.J. Why did we abandon the can-opener capsulotomy? An explanation regarding why surgeons transitioned from this technique to the continuous curvilinear capsulorhexis. *Cataract and Refractive Surgery Today*, p.43-45, 2007.

ARISAWA, E.A.L.; MORAES, E.; ROCHA, R.F.; ALMEIDA, J.D. Marcadores Biológicos: PCNA e Ki-67 Breve Revisão. *Revista da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos*, v.2, p.54-60, 1999.

ARGENTO, C.; NUÑEZ, E.; WAINSTEIN, R. Incidence of postoperative posterior capsular opacification with types of senile cataracts. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.18, p.586-588, 1992.

ARON-ROSA, D.; ARON, J.J.; GRIESEMANN, M.; THYZEL, R. Use of the neodymium-YAG laser to open the posterior capsule after lens implant surgery: a preliminary report. *Journal of American Intraocular Implant Society*, v.6, p.352-354, 1980.

ASLAM, T.M.; DEVLIN, H.; DHILLON, B. Use of Nd:YAG laser capsulotomy. *Survey of Ophthalmology*, v.48, p.594-612, 2003.

- Normas da ABNT 6023/2002

AWASTHI, N.; GUO, S.; WAGNER, B.J. Posterior capsular opacification a problem reduced but not yet eradicated. *Archives of Ophthalmology*, v.127, p.555-562, 2009.

BANKS, W.J. *Histologia Veterinária Aplicada*. 2ed. São Paulo: Manole, 1992, 629p.

BARNETT, K.C. The diagnosis and differential diagnosis of cataract in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, v.26, p.305-316, 1985.

BARNETT, K.C. Inherited eye disease in the dog and cat. *Journal of Small Animal Practice*, v.29, p.462-475, 1988.

BEAM, S.; CORREA, M.T.; DAVIDSON, M.G. A retrospective-cohort on the development of cataracts in dogs with diabetes mellitus: 200 cases. *Veterinary Ophthalmology*, v.2, p.169-172, 1999.

BEKIBELE, C.O.; MUSORO, A.L. Hydro-dissection and posterior capsule opacification. *Nigerian Journal of Surgical Research*, v.7, p.278-280, 2005.

BOZUKOVA, D.; PAGNOULLE, C.; PAUW-GILLET, M.C.; DESBIEF, S.; LAZZARONI, R.; RUTH N.; JEROME, R.; JEROME C. Improved Performances of Intraocular Lenses by Poly(ethylene glycol) Chemical Coatings. *Biomacromolecules*, v.8, p.2379-2387, 2007.

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

BROWN, D.C.; GATTER, K.C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*, v.17, p.489-503, 1990.

BRUNO, S.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolifation*, v.25, p.31-40, 1992.

- Normas da ABNT 6023/2002

BUEHL, W.; SACU, S.; FINDL, O. Association between intensity of posterior capsule opacification and contrast sensitivity. *American Journal of Ophthalmology*, v.140, p.927-930, 2005.

BURNIER, M.N.N.; NEVES, R.A.; PEREIRA, M.G.; ALBERTI, V.N.; RIGUEIRO, M. Aplicações da técnica de imunoperoxidase em patologia ocular. *Arquivos do Instituto Penido Burnier*, v.30, p.46-48, 1988.

CAMPARINI, M.; MACALUSO, C.; REGGIANI, L.; MARAINI, G. Retroillumination versus reflected-light images in the photographic assessment posterior capsule opacification. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.41, p.3074-3079, 2000.

CHENG, C.Y.; YEN, M.Y.; CHEN, S.J.; KAO, S.C.; HSU, W.M.; LIU, J.H. Visual acuity and contrast sensitivity in different types of posterior capsule opacification. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, v.27, p.1055-1060, 2001.

CHOU YH; ROSENVAR E; GOLDMAN RD Phosphorylations and disassembly of intermediate filaments in mitotic cells. *Proceedings of Nationall Academy Sciences*, v.86, p.1885-1889, 1989.

CHU, P.K.; CHEN, J.Y.; WANG, L.P.; HUANG, N. Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering*, v.36, p.143-206, 2002.

COCHARD, P.; PAULIN, D. Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo *in vivo*. *The Journal of Neuroscience*, v.4, p. 2080-2094, 1984.

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

COLTRO, L.; ALVES, R.M.V. Tratamento superficial de filmes flexíveis por plasma. *Informativo CETEA - Centro de Tecnologia de Embalagem*, v.13, n.2, 2001.

COOMBES, A.; SEWARD, H. Posterior capsular opacification prevention: IOL design and material. *British Journal of Ophthalmology*, v. 83, p. 640-641, 1999.

- Normas da ABNT 6023/2002

DARBY, I., SKALLI, O.; GABBINI, G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Laboratory Investigation*, v.63, p.21-29, 1990.

DAVIDSON, M.G.; WORMSTONE, M.; MORGAN, D.; MALOKOF, R.; ALLEN, J.; MCGAHAN, M.C. Ex vivo canine lens capsular sac explants lens capsular. *Graefe's Archive of Clinical and Experimental Ophthalmology*, v.238, p.708–714, 2000.

DAVIDSON, M.G. Towards a better canine intraocular lens. *Veterinary Ophthalmology*, v. 4, n.1, 2001.

DAVIS, F.A. The anatomy and histology of eye and orbit of the rabbit. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, v.27, p. 400-441, 1929.

DEULLMANN, H.D. Eye. In: DELLMANN, H.D.; EURELL, J.A. *Textbook of Veterinary Histology*. 5ed Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, 1998, cap. 17, p.333-344.

DUNCAN, G.; WANG, L.; NEILSON, G.J.; WORMSTONE, I.M. Lens cell survival after exposure to stress in the closed capsular bag. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.48, p.2701-2707, 2007.

DZIEZYC, J. Cataract surgery. Current approaches. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.20, n.3, p.737-754, 1990.

ELOY R.; PARRAT, D.; DUC, T.; LEGEAY, G.; BECHETOILLE, A. In vitro evaluation of inflammatory cell response after CF4 plasma surface modification of ploy (methyl methacrylate) intraocular lenses. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.19, p. 364-370, 1993.

EVANS, R.M. Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family. *Bioessays*, v. 20, p. 79-86, 1998.

EVANS, H.E.; DELAHUNTA, A. *Guia para a Dissecção do Cão*. 5.ed. Guanabara e Koogan: Rio de Janeiro. 2001. 250p

FANKHAUSER, F.; ROUSSEL, P.; STEFFEN, J. Clinical studies on the efficiency of high power laser radiation upon some structures of the anterior segment of the eye. First experiences of the treatment of some pathological conditions of the anterior segment of the human eye by means of a Qswitched. *International Ophthalmology*, v.3, p.129-139, 1981.

FINDL, O.; BUEHL, W.; MENAPACE, R.; GEORGOPOULOS, M.; RAINER, G.; SIEGL, H.; KAIDER, A.; PINZ, A. Comparasion of 4 methods for quantifying posterior capsule opacification. *Journal of Cataract & Refract Surgery*, v.29, p.106 -111, 2003.

FISCHER, C.A. Geriatric ophthalmology. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.19, n.1, p.103-123, 1989.

GAIDDON, J.; ROSOLEN, S.G.; COOK, C.S.; PEIFFER JUNIOR, R. Use of biometry e keratometry for determining optimal power for intraocular lens implant in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.52, n. 5, p.781-783, 1991.

GAIDDON, J.; ROSOLEN, S.G.; LALLEMNET, P.E.; Le GARGASSON, J.F. New intraocular lens (IOL) for dogs: The foldable cani 15S. Preliminary results of surgical technique. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.38, 1997.

GELATT, K.N. *Veterinary Ophthalmology*. 4.ed. Oxford:Blackwell Publising, 2007. p.859-931.

GELATT, K.N.; MACHAY, E.O. Prevalence of primary breed-related cataracts in the dog in North America. *Veterinary Ophthalmology*, v.8, p.101-111, 2005.

GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H., STEIN, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer*, v.31, p.13-20, 1983.

GERDES, J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferationassociated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal Immunology*, v. 133, p. 1710-1715, 1984.

GLOVER, T.D.; CONSTANTINESCU, G.M. Surgery for cataract. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.27, p.1143-1173, 1997.

GOMES, A.C.B.R.; PAULINO, L.V. Incidência de opacificação de cápsula posterior em cirurgias de facoemulsificação realizadas na Faculdade de Medicina do ABC. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*, v.25, p.40-43, 2001.

- Normas da ABNT 6023/2002

GORDO, I.N.A. *Complicações da cirurgia de cataratas por facoemulsificação em cães*. 2012. 110f. Tese (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

GWON, A.; GRUBER, L.; MANTRAS, C.; CUNANAN, C. Lens regeneration in New Zealand albino rabbits after endocapsular cataract extraction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.34, p.2124–2129, 1993.

HALL, P.A.; LEVISON, D.A. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *Journal of Clinical Pathology*, v.43, p.184-192 1990.

HOLLICK, E.J.; SPALTON, D.J.; URSELL, P.G.; PANDE, M.V. Lens epithelial cell regression on the posterior capsule with different intraocular lens materials. *British Journal of Ophthalmology*, v.82, p.1182-1188, 1998.

IGNAJATOVIC, Z. Secondary cataracts in extreme myopia. *Serbian Archives*, v.126, p.239-241, 1998.

IZA'K, M.; OSLANEC, J.; GAFRIKOVA, J. Extraction of a clear lens-cataract as refractive surgery in severe myopia. *Ceska Slovenska Oftalmologie*, v.52, p.52-82, 1996.

JOSE, R.M.J.; BENDER, L.E.; BOYCE, J.F.; HEATLEY, C. Correlation between the measurement of posterior capsule opacification severity and visual function testing. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v. 31, p. 534–542, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.U. *Biologia Estrutural dos tecidos – Histologia*. 1ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2005, 225p.

KATAYAMA, Y.; KOBAYAKAWA, S.; YANAGAWA, H.; TOCHIKUBO, T. The relationship between the adhesion characteristics of acrylic intraocular lens materials and posterior capsule opacification. *Ophthalmic Research*. v. 39, p. 276-281, 2007.

KECOVÁ, H.; NECAS, A. Phacoemulsification and Intraocular Lens Implantation: Recent Trends in Cataract Surgery. *Acta Veterinaria Brunensis*, v.73, p.85-92, 2004.

- Normas da ABNT 6023/2002

KEIL, S.M.; DAVIDSON, H.J. Canine cataracts: A review of diagnostic and treatment procedures. *Veterinary Medicine*, p.14-39, 2001.

KIERSZEMBAUM, A.L. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 679p.

KIM, M.K.; PARK, I.S.; PARK, H.D.; WEE, W.R.; LEE, J.H.; PARK, K.D.; KIM, S.H.; KIM, Y.H. Effect of poly (ethylene glycol) graft polymerization of poly (methyl methacrylate) on cell adhesion. *In vitro* and *in vivo* study. *Journal of Cataract Refract Surgery*, v.27, p.766 - 774, 2001.

KIM, J.Y.; JEONG, S.; HAN, H.; WILLIAMS, D.L. Evaluation of sutureless cataract surgery in the dog. *Intern. Journal of Applied Research in Medicine*, v.6, p.101-110, 2008.

LAUS, J.L.; TORRECILLAS, A.; BRUNELLI, J.; PONTES ORIÁ, A.; ALMEIDA, D.E.; TALIERI, I.C. Cirurgias da lente. In HERRERA D. (Ed). *Oftalmologia Clínica em Animais de Companhia*. 1º Ed. Brasil: MedVet Livros, 2008. p. 155-172.

LAYFIELD, L.J. *Anatomy of the the human eye*. 2005 Disponível em: <http://www.images.missionforvisionusa.org/anatomy/2005/10/eye-anatomy-human.html>. Acesso em 27 mai.2013.

LAZARIDES, E. Intermediate filaments: A chemically heterogeneous developmentally regulated class of protein. *Annual Review fo Biochemistry*, v.51, p.219-250, 1982.

LEE, H.II; KIM, M.K.; KO, J.H.; LEE, H.J.; WEE, W.R.; Lee, J.H. The Efficacy of an Acrylic Intraocular Lens Surface Modified with Polyethylene Glycol in Posterior Capsular Opacification. *Journal of Korean Medicine Science*, v.22, p.502-507, 2007.

LEGEAIS, J.M.; LEGEAY, G.; BRIAT, B.; RENARD, G. *In vivo* study of a fluorocarbon polymer-coated intraocular lens in a rabbit model. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.24, p.371-379, 1998.

LI, J. Synthesis of polyethyleneglycols (PEGs): derivatives and applications in biomaterials. *Biomacromolecules*, p.430, 2001.

- Normas da ABNT 6023/2002

LIN, L.; WANG, Y.; HUANG, X.D.; XU, Z.K.; YAO, K. Modification of hydrophobic acrylic intraocular lens with poly (ethylene glycol) by atmospheric pressure glow discharge: A facile approach. *Applied Surface Science*, v.256, p.7354-7364, 2010.

LIU, Y.C.; WONG, T.T.; MEHTA, J.S. Intraocular lens as a drug delivery reservoir. *Current Opinion in Ophthalmology*, v.24, p.53-59, 2013.

MALOOF, A.J.; NEILSON, G.; MILVERTON, E.J.; PANDEY, S.K. Selective and specific targeting of lens epithelial cells during cataract surgery using sealed-capsule irrigation. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.29, p.1566-1568, 2003.

LUNDVALL, A.; ZETTERSTROM, C.; LUNDGREN, B.; KUGELBERG, U. Effect of 3-piece AcrySoft and downsized heparin surface-modified poly(methyl methacrylate) intraocular lenses in infant rabbit eyes. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.29, p.159-163, 2003

MENAPACE, R.; WIRTITSCH, M.; FINDL, O.; BUEHL, W.; WIRTITSCH, M.; LEYDOLT, C.; KRIECHBAUM K. Effect of anterior capsule polishing on posterior capsule opacification and neodymium: YAG capsulotomy rates: three-year randomized trial. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.31, p.2067, 2005.

MIYATA, K.; KATO, S.; NEJIMA, R.; MIYAI, Z.; HONBO, M.; OHTANI, S. Influences of optic edge design on posterior capsule opacification and anterior capsule contraction. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, v.85, p.99-102, 2007.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. *Embriologia Básica*. 7ed. Rio de janeiro: Elsevier, 2008. 365p.

MORARESCU, D.; WEST-MAYS, J.A.; SHEARDOWN, H.D. Effect of delivery of MMP inhibitors from PDMS as a model IOL material on PCO markers. *Biomaterials*, v.31, p.2399-2407, 2010.

MURRIL, C.A.; STANFIELD, D.L.; VAN BROCKLIN, M.D. Capsulotomy. *Optometry Clinical*, v.4, p.69-83, 1995.

- Normas da ABNT 6023/2002

NAGAMOTO, T.; EGUCHI, G.; BEEBE, D.C. Control of α -smooth muscle actin expression in cultured lens cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.38, n.43, 1997.

NIKEGHBALI, A. Effect of two capsulotomy methods on posterior capsule opacification after cataract surgery. *Archives of Iranian Medicine*, v.5, 2002.

NISHI, O.; NISHI, K.; Preventing posterior capsule opacification by creating a discontinuous sharp bend in the capsule. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v. 25, p. 521-526, 1999.

NISHI, O.; NISHI, K.; WICKSTROM, K. Preventing lens epithelial cell migration using intraocular lenses with sharp rectangular edges. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v. 26, p. 1543-1549, 2000.

NISHI, O.; YAMAMOTO, N.; NISHI, K.; NISHI, Y. Contact inhibition of migrating lens epithelial cells at the capsular bend created by a sharp-edged intraocular lens after cataract surgery. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.33, p.1065-1070, 2007.

OFRI, R. Optics and physiology of vision. In: GELATT, K.N. *Veterinary Ophthalmology*. Florida: Blackwell Publishing, 2007. p.183-219.

PANDEY, S.K.; WILSON, M.E.; TRIVEDI, R.H.; IZAK, A.; MACKY, T.A.; WERNER, L. Pediatric cataract surgery and intraocular lens implantation: current techniques, complications and management. *International Ophthalmology Clinics*, v.41, p.175 - 196, 2001.

PANDEY, S.K.; WILSON, M.E.; WERNER, L.; RAM, J.; APPLE, D.J. Childhood cataract surgical technique, complications and management. In: GARG A.; PANDEY SK. *Textbook of Ocular Therapeutics*. p.457-486, 2002.

PANDEY S.K.; APPLE D.J.; WERNER L.; MALOOF, A.J.; MILVERTON, E.J.; Posterior Capsule Opacification: A Review of the Aetiopathogenesis, Experimental and Clinical Studies and Factors for Prevention. *Indian Journal of Ophthalmology*, v.52, p. 99-112, 2004.

- Normas da ABNT 6023/2002

- PEI, C.; XU, Y.; JIANG, J.X.; CUI, L.J.; LI, L.; QIN, L. Application of sustained delivery microsphere of cyclosporine A for preventing posterior capsular opacification in rabbits. *International Journal of Ophthalmology*, v.6, n.1, 2013.
- PENG, Q.; APPLE, D.J.; VISESSOOK, N.; WERNER L.; PANDEY S.K.; ESCOBAR-GOMEZ M. Surgical prevention of posterior capsule opacification. Part II. Enhancement of cortical clean up by focusing on hydrodissection. *Journal of cataract & Refractive Surgery*, v.26, p.188-197, 2000a.
- PENG, Q.; APPLE, D.J.; VISESSOOK, N.; WERNER L.; PANDEY S.K.; ESCOBAR-GOMEZ M. Surgical prevention of posterior capsule opacification.. Part III. Intraocular lens optic barrier effect as a second line of defense. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.26, p.198-213, 2000b.
- PERSHING, S.; KUMAR, A. Phacoemulsification versus extracapsular cataract extraction: where do we stand? *Current Opinion in Ophthalmology*, v.22, p.37-42, 2011.
- POLAK, J.M.; VAN NOORDEN, S. *Imunocytochemistry: modern methods and applications*. 2th ed., Wright, Bristol; 1986, 702p.
- RAJ, S.M.; VASAVADA, A.R.; JOHAR, K.D.; VASAVADA, V.A.; VASAVADA, V.A. Post-operative capsular opacification: a review. *International Journal of Biomedical Science*, v. 3, n. 4, p.237-250, 2007.
- RAJ, S.M.; VASAVADA, A.R.; JOHAR, K.D.; VASAVADA, V.A.; VASAVADA, V.A. Post-operative capsular opacification. *Nepalese Journal of Ophthalmology*, v. 1, cap. 1, p. 43-59, 2009.
- RAKIC, J.M.; GALAND, A.; VRENSSEN, G.F. Separation of fibres from the capsule enhances mitotic activity of human lens epithelium. *Experimental Eye Research*, v.64, p.67, 1997.
- RAKIC, J.M.; GALAND, A., VRENSSEN, G.F.J.M. Lens Epithelial Cell Proliferation in Human Posterior Capsule Opacification Specimens. *Experimental Eye Research*, v.71, p.489-494, 2000.

- Normas da ABNT 6023/2002

RAM, J.; KAUSHIK, S.; BRAR, G.S.; GUPTA, A. Neodymium YAG capsulotomy rates following phacoemulsification with implantation of PMMA, silicone, and Acrylic intraocular lenses. *Ophthalmic Surgery Lasers and Imaging*, v.32, p.375-382, 2001.

RAMOS-VARA, J.A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vetetrinary Pathology*, v.42, p.405-426, 2005.

RAVALICO, G.; TOGNETTO, D.; PALOMBA, M.; BUSATTO, P.; BACCARA, F. Capsulorhexis size and posterior capsule opacification. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v. 22, p.98-1031, 1996.

REYS, J.A.A.; VEIGA, M.A.L.; SANZ, C.M.; BARRERA, F.M.M.; Abreu GONZÁLEZ, R.A.; ESTÉVEZ, J.J.A. Síndrome de Contracción Capsular: Estudio histopatológico e imunohistoquímico. *Microcirurgia Ocular*, v.2, 1999.

RUIT, S.; TABIN, G.; CHANG, D.; BAJRACHARYA, L.; KLINE, D.C.; RICHHEIMER, W.; SHRESTHA, M.; PAUDYAL, G. A prospective randomized clinical trial of phacoemulsification vs manual sutureless small-incision extracapsular cataract surgery in Nepal. *American Journal of Ophthalmology*, v.143, p.32–38, 2007.

SACU, S.; MENAPACE, R.; BUEHL, W.; RAINER, G. Effect of intraocular lens optic edge design and material on fibrotic capsule opacification and capsulorhexis contraction. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.30, p.1875, 2004.

SAIKA, S.; KAWASHIMA, Y.; MIYAMOTO, T.; OKADA, Y.; TANAKA, S.I.; OHMI, S.; MINAMIDE, A.; YAMANAKA, O.; OHNISHI, Y.; OOSHIMA, A.; YAMANAKA, A. Immunolocalization of prolyl 4-hydroxylase subunits, α -smooth muscle actin, and extracellular matrix components in humans lens capsules with lens implants. *Experience Eye Research*, v.66, p.283-294, 1998.

SAIKA, S.; MIYAMOTO, T.; OHNISHI, Y. Histology of anterior capsule opacification with a polyHEMA/ HOHEXMA hydrophilic hydrogel intraocular lens compared to poly(methyl methacrylate), silicone, and acrylic lenses. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.29, cap.6, p.1198, 2003.

- Normas da ABNT 6023/2002

- SAXBY, L.; ROSEN, E.; BOULTON, M. Lens epithelial cell proliferation, migration, and metaplasia following capsulorhexis. *Brithish Journal of Ophtalmology*, v.82, p.945-952, 1998.
- SCHAUMBERG, D.A.; DANA, M.R.; CHRISTEN, W.G.; GLYNN, R.J. A systematic overview of the incidence of posterior capsular opacification. *Ophthalmology*, v.105, p.1213-1221, 1998.
- SERENO, M.G. *Opacidade de cápsula posterior após implante de lentes intraoculares tratadas por plasma de flúor e polietilenoglicol em coelhos*. 2012. 113f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- SHIRAI, K.; SAIKA, S.; OKADA, Y.; ODA, S.; OHNISHI, Y. Histology and immunohistochemistry of fibrous posterior capsule opacification in an infant. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.30, p.523-526, 2004.
- SIGLE, K.J.; NASISSE, M.P. Long-term complications after phacoemulsification for cataract removal in dogs: 172 cases (1995-2002). *Journal of American Veterinary Medical Association*, V.2, p.74-79, 2006.
- SINGER, J.A.; NICHAMIN, L.D.; APPLE, D.J.; MCDONALD, M.B.; DODICK, J.M.; JOHNSON, S.H.; MAMALIS, N. Posterior capsular opacification: Etilogy, treatment, and prevention. *Eyeworld*, v.11, n.4, p.29-31, 2000.
- SINHA, R.; SHEKHAR, H.; SHARMA, N.; TITIYAL, J.S.; VAJPAYEE, R.B. Posterior capsular opacification: A review. *Indian Journal of Ophtalmology*, V.61, p.371-376, 2013.
- SLATTER, D. *Fundamentos de oftalmologia veterinária*. 3 ed. São Paulo: Roca. 2005, 686p.
- SMITH, R.T.; MOSCOSO, W.E.; TROKEL, S.; AURAN, J. The barrier function in neodymium of YAG laser capsulotomy. *Archives of Ophthalmology*, v.120, p.645-652, 1999.
- SPALTON, D.J. Posterior capsular opacification after cataract surgery. *Eye*, v.13, p.489-492, 1999.

- Normas da ABNT 6023/2002

STEINBERG, E.P.; JAVITT, J.C.; SHARKEY, P.D. The content and cost of cataract surgery. *Archives of Ophthalmology*, v.111, p.1041-1049, 1993.

TERRY, A.; STORK, W.J. Neodymium:YAG laser for posterior capsulotomy. *American Journal of Ophthalmology*, v.96, p.716-720, 1996.

THIERY, J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, v.2, p.442-454, 2002.

VARGAS, L.G.; IZAK, A.M.; APPLE, D.J.; WERNER, L.; PANDEY, S.K.; TRIVEDI, R.H. Single Piece AcrySof Implantation of a single-piece, hydrophilic, acrylic, minus-power foldable posterior chamber intraocular lens in a rabbit model: clinicopathologic study of posterior capsule opacification. *Journal of Cataract & Refract Surgery*, v.29, p.1613-1620, 2003.

VASAVADA, A.R.; CHAUHAN, H.; SHAH, G. Incidence of posterior capsular plaque in cataract surgery. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. v.23, p.798, 1997.

VASAVADA, A.R.; DHOLAKIA, S.A.; RAJ, S.M.; SINGH, R. Effect of corticalcleaving hydrodissection on posterior capsule opacification in age-related nuclear cataract. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. v.32, p.1196, 2006.

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

WAZAWA, T.; ISHIZUKA-KATSURA, Y.; NISHIKAWA, S.; IWANE, A. H.; AOYAMA, S. Grafting of Poly (ethylene glycol) onto Poly (acrylic acid) - Coated Glass for a Protein-Resistant Surface. *Analytical Chemistry*, v.78, p.2549-2556, 2006.

WEIBLINGER, R.P. Review of the clinical literature on the use of the Nd:YAG laser for posterior capsulotomy. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.12, p.162-170, 1986.

- Normas da ABNT 6023/2002

WEJDE, G.; KUGELBERG, M.; ZETTERSTRÖM, C. Position of anterior capsulorhexis and posterior capsule opacification. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, v.82, p.531-534, 2004.

WERNER, L.; LEGEAIS, J.; NAGEL, M.; RENARD, G. Evaluation of Teflon-coated intraocular lenses in an organ culture method. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.46, p.347-354, 1999.

WERNER, L.; PANDEY, S.K.; ESCOBAR-GOMEZ, M.; VISESSOOK, N.; PENG, Q.; APPLE, D.J. Anterior capsule opacification; a histopathological study comparing different IOL styles. *Ophthalmology*, v.107, p.463- 471, 2000.

WERNER, L.; MAMALIS, N.; PANDEY, S.K.; IZAK, A.M.; NILSON, C.D.; DAVIS, B.L.; WEIGHT, C.; APPLE, D. Posterior capsule opacification in rabbit eyes implanted with hydrophilic acrylic intraocular lenses with enhanced square edge. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.30, p.2403-2409, 2004.

WERNER, L.; MAMALIS, N.; IZAK, A.M.; PANDEY, S.K.; DAVIS, B.L.; NILSON, C.D.; WEIGHT, C.; APPLE, D. Posterior capsule opacification in rabbit eyes implanted with 1-piece and 3-piece hydrophobic acrylic intraocular lenses. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.31, p.805-811, 2005.

WHITLEY, R.D.; McLAUGHIN, S.A.; WHITLEY, E.M.; GILGER, B.C. Cataract removal in dogs: The presurgical considerations. *Veterinary Medicine*, v.88, p.848-858, 1993.

WILCOCK, B.P. Eye and ear. In: JUBB; KENNEDY; PALMER'S. *Pathology of Domestic Animals*. 5ed. Elsevier, 2007. chap.04 p.459-543.

WILLIAMS, D.L.; BOYDELL, I.P.; LONG, R.D. Current concepts in the management of canine cataract: a survey of techniques used by surgeons in Britain, Europe and the UDA and a review of recent literature. *Veterinary Record*, v.138, p.347-353, 1996.

WILSON, D.J.; WILLIAMS, R.L.; POND, R.C. Plasma modification of PTFE surfaces. Part I: surfaces immediately following plasma treatment. *Surface and Interface Analysis*, v.31, p.385-396, 2001.

- Normas da ABNT 6023/2002

- WILSON, D.J.; RHODES, N. P.; WILLIAMS, R.L. Surface modification of a segmented polyetherurethane using a low powered gas plasma and its influence on the activation of the coagulation system. *Biomaterials*, v.24, p.5069-5081, 2003.
- WONG, T.T.L.; DANIELS, J.T.; CROWSTON, J.G.; KHAW, P.T. MMP inhibition prevents human lens epithelial cell migration and contraction of the lens capsule. *Brithish Journal of Ophtalmology*, v.88, p.868-872, 2004.
- WORMSTONE, I.M. Posterior capsule opacification: a cell biological perspective. *Experimental Eye Research*, v.74, p.337-347, 2002.
- WORMSTONE, I. M.; WANG, L.; LIU, C.S.C. Review Posterior capsule opacification. *Experimental Eye Research*, v.88, p.257-269, 2009.
- YAN, Q.; PERDUE, N.; SAGE, E.H. Differential responses of human lens epithelial cells to intraocular lenses in vitro: hydrophobic acrylic versus PMMA or silicone discs. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophtalmology*. v.243, p.1253-1263, 2005.
- YERUSHALMI, R.; WOODS, R.; RAVDIN P.M.; HAYES, M.M.; GELMON, K.A. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncology*, v.11, p.174-183, 2010.
- YUAN, Z.; SUN, H.; YUAN, J. A 1 year study on carbon, titanium surface-modified intraocular lens in rabbit eyes. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, v.242, p.1008-1013, 2004.
- YUEN, C.; WILLIAMS, R.; BATTERBURY, M.; GRIERSON, I. Modification of the surface properties of a lens material to influence posterior capsular opacification. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, v.34, p.568-574, 2006.
- ZACZEK, A.; ZETTERSTROM, C. Posterior capsule opacification after phacoemulsification in patients with diabetes mellitus. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.25, p.233–237, 1999.
- ZAR, J.H. Biostatistical analysis, 5ed. New Jersey: Prentice-Hall. 2009. 994p.
- ZUCARRI, D.A.P.C; SANTANA, A.E. ROCHA, N.S. Expressão dos filamentos intermediários no diagnóstico dos tumores mamários de cadelas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.54, p.586-591, 2002.

- Normas da ABNT 6023/2002

Trabalho científico

8. Trabalho Científico

Trabalho a ser enviado para *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia / Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA CÁPSULA POSTERIOR ASSOCIADA AO IMPLANTE DE LENTE INTRAOCULAR COM SUPERFÍCIE MODIFICADA COM PLASMA DE FLÚOR E POLIETILENOGLICOL EM COELHOS

HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF POSTERIOR CAPSULE ASSOCIATED WITH INTRAOCULAR LENS IMPLANT WITH MODIFIED SURFACE USING FLUORINE AND POLIETHYLENE GLYCOL PLASMA IN RABBITS

V.L. Souza*, C. V. S. Brandão¹, C.H. Pellizzon², C.S. Perches¹, C.A. Estanislau¹, N.R. Rodas¹, J.J.T. Ranzani¹; C.R. Padovani²

*Pós graduanda da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; ¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Botucatu, SP; ²Instituto de Biociências – Botucatu, SP.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento da superfície de lentes intraoculares (LIOs) acrílicas utilizando-se plasma de Flúor ou polietilenoglicol (PEG) na prevenção da OCP. Foram utilizados 40 olhos de coelhos, submetidos à cirurgia de facoemulsificação, e distribuídos em quatro grupos experimentais, sendo, grupo Controle (CG), coelhos sem implante de LIO; grupo com LIO tratada com plasma de polietilenoglicol (GPEG), grupo com LIO tratada com plasma de Flúor (GF), e grupo com LIO comercial (GL). As cápsulas posteriores das lentes dos grupos foram avaliadas por meio de análise histopatológica (morfometria e imunohistoquímica). Os grupos GPEG e GL apresentaram menor espessura da cápsula posterior na avaliação inicial (12 semanas) em relação ao GC. No período final de avaliação, os tratamentos da superfície da LIO à base de plasma de Flúor e PEG não reduziram o desenvolvimento das alterações histológicas associadas à opacidade de cápsula posterior. O tratamento das superfícies

das LIOs com plasma de Flúor e PEG pode ser realizado como adjuvante na prevenção da opacidade de cápsula posterior, pois não causa alterações na morfologia da lente após facoemulsificação.

Palavras-chave: plasma, Flúor, polietilenoglicol, OCP, morfometria, imunohistoquímica.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of surface treatment of acrylic IOLs using Fluorine plasma or polyethylene glycol (PEG) in the prevention of PCO. Forty rabbit eyes that underwent phacoemulsification were used and distributed into four experimental groups: Control group (CG), rabbits without IOL implantation; IOL group treated with polyethylene glycol plasma (GPEG), IOL group treated with fluoride plasma (GF), and commercial IOL group (GL). The posterior capsule of the lens were evaluated by histopathological analysis, including morphometric and immunohistochemical studies. The GPEG and GL groups presented thinner posterior capsule at initial assessment (12 weeks) compared to control group. At the end of evaluation (six months), the treatment of IOL surface with fluorine and polyethylene glycol plasma did not reduce the development of histological changes associated with posterior capsule opacification. The surface treatment of IOLs with Fluoride and polyethylene glycol can be performed as an adjuvant in prevention PCO, because it does not cause changes in the morphology of lens after phacoemulsification surgery

Keywords: plasma, Fluorine, polyethylene glycol, PCO, morphometry, immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO

A opacidade de cápsula posterior (OCP), denominada também como catarata secundária, é a complicação mais comum após a remoção cirúrgica da catarata. No decorrer da sua evolução, verifica-se crescimento, proliferação, migração e transformação das células do epitélio da lente (CEL) presentes na cápsula anterior remanescente, sob a cápsula posterior inicialmente livre de células (RAJ *et al.*, 2009; WORMSTONE, 2009). O tratamento da LIO utilizando-se o processo de plasma, independentemente do plasma utilizado, promove a “ativação” da superfície, ou seja, a incorporação de grupos polares que modificariam suas características superficiais (efeito na adesão ou repelência celular e proteica) (COLTRO e ALVES, 2001; KIM *et al.*, 2001).

A repelência celular e proteica do polietilenoglicol (PEG), decorrente de suas propriedades atóxica, não imunogênica e não antigênica, seleciona-o como substância adequada a ser aplicada nas superfícies dos materiais para a confecção de LIOs (KIM *et al.*, 2001; BOZUKOVA *et al.*, 2007; SERENO, 2012). A utilização de grupos fluorados, como hexafluoreto de enxofre ou tetrafluorocarbono, é capaz de conferir alta hidrofobicidade às superfícies favorecendo à biointegração dos materiais biológicos (WERNER *et al.*, 1999).

As considerações descritas acima, associada a alta morbidade da OCP na Medicina Veterinária, bem como os escassos estudos relacionados à mesma, especialmente com modificação na superfície da lente e avaliação da opacidade estimularam a realização deste estudo, o qual teve por objetivo avaliar e comparar a cápsula posterior da lente, por meio de análise histopatológica, após facoemulsificação e implante de lente intraocular (LIO), modificada com plasma de Flúor ou de polietilenoglicol (PEG), em coelhos. Bem como, identificar as alterações histomorfológicas da cápsula posterior após colocação de LIO, analisar a imunomarcagem do saco capsular, considerando os marcadores α actina, Ki67 e vimentina, e comparar entre os diferentes tratamentos instituídos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 40 olhos de animais da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Norfolk, fêmeas, com idade variando entre 70 e 100 dias, e com peso entre 2 e 3Kg. Os coelhos foram fornecidos pelo Biotério Central da UNESP campus de Botucatu, e os procedimentos experimentais desenvolvidos seguiram as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO).

Os animais foram previamente submetidos aos exames clínicos e oftalmológicos de rotina a fim de se descartar qualquer alteração ocular. Foram distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos experimentais, constituídos por 10 animais, designados de acordo com o tipo de tratamento efetuado: Grupo com LIOs sem tratamento (GL), Grupo com LIOs submetidas a ativação superficial por plasma de Flúor (GF), Grupo com LIOs submetidas ao processo de plasma e polimerizadas com polietilenoglicol (GPEG) e Grupo controle, olhos submetidos apenas ao procedimento cirúrgico de facoemulsificação, sem implante LIO (GC). Então, foram anestesiados utilizando-se como medicação pré anestésica: quetamina (20 mg/kg) associada à xilazina (1 mg/kg) e morfina (0,5mg/kg), todos por via intramuscular (IM). A anestesia tópica ocular foi realizada utilizando-se colírio a base de

proximetacaína 0,5%. Todos os animais foram submetidos à técnica de facoemulsificação bimanual e implantação ou não de lente intraocular dobrável acrílica (Ioflex - Mediphacos hidrofílica) dependendo do seu grupo experimental. No pós-cirúrgico imediato, o meloxicam (0,2 mg/kg/IM) foi administrado bem como, durante três dias pós operatório (0,1mg/kg), a cada 24 horas, por via subcutânea. Como profilaxia tópica antimicrobiana e antiinflamatória foram administrados colírio de tobramicina 0,3% e colírio de acetato de prednisolona 1%, e para controle da hipertensão ocular pós operatória foi instilado colírio de brimonidina 0,03% a cada 6 horas durante 10 dias. Após o procedimento cirúrgico os animais foram identificados e mantidos em gaiola individuais com água potável e ração comercial *ad libitum*. Os animais foram submetidos a exames clínicos e oftalmológicos rotineiramente.

Ao final de 12 semanas após o procedimento cirúrgico de facoemulsificação (M12), quatro animais de cada grupo foram eutanasiados, utilizando-se anestesia com acepromazina (1,5mg/Kg) associada quetamina (20 mg/Kg), ambas por via IM, seguida pela administração intravenosa de tiopental (25 mg/kg) e de cloreto de potássio 19,1% (2 ml/Kg); em seguida, todos foram submetidos a enucleação do olho operado. Os demais coelhos de cada grupo (n=6) foram mantidos durante 24 semanas de pós operatório (M=24), e então submetidos ao mesmo protocolo e procedimento anteriormente descrito.

Os bulbos oculares enucleados foram fixados em formol neutro tamponado 10% durante 48 horas, a seguir, as cápsulas da lente foram removidas. As cápsulas foram seccionadas longitudinalmente obtendo-se duas metades do saco capsular; as LIO quando presentes, foram juntamente incisadas, sendo retiradas posteriormente. Os sacos capsulares foram macroscopicamente avaliados, quanto o seu aspecto, então incluídos em álcool 70% durante 12 horas, e submetidos ao processo histológico para avaliação histomorfométrica e avaliação imunohistoquímica.

Na colocação HE, foram analisadas as cápsulas anterior e posterior, utilizado-se microscópio Leica DMLD® com software de captura de imagens Leica Qwin Standard Versão 3.5.0. Nas imagens capturadas foram mensuradas a distância entre cápsula anterior e posterior (μm), espessuras das cápsulas anterior e posterior e avaliada a morfologia celular presente nas mesmas. Foram utilizados escores de classificação para celularidade, ou seja células epiteliais da lente, observadas na cápsula

posterior e o enrugamento na cápsula posterior, sendo (0) ausente, (1) leve, (2) moderada e (3) grave.

As amostras dos sacos capsulares, após coladas em lâminas silanizadas e carregadas positivamente, foram submetidas à desparafinização e hidratação. Foram realizados os bloqueios da peroxidase endógena (H_2O_2 a 3%) e proteína inespecífica com 1% de BSA para incubação *overnight* com os anticorpos Ki67 (SP6 – Abcam®/ 1:100); alfa-actina (CGA7 – Santa Cruz®/ 1:50) e para vimentina (V9/ Ivintrogen®/ 1:100). Após a incubação com o anticorpo primário, as amostras foram processadas com o kit REVEAL Sistema de Detecção Livre de Biotina-Spring Biogen para revelação para peroxidase e contra-corado com hematoxilina. As amostras também foram analisadas no microscópio Leica DMLD® acoplado com o software de captura de imagens, seguida da análise quantitativa no programa AVSoft BioView 4®.

Na análise estatística foi utilizada a técnica da análise de variância não paramétrica para o modelo com os dois fatores (grupos e momentos de avaliação) complementado com o teste de comparações múltiplas de Dunn (ZAR, 2009), considerando o nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise histomorfométrica foi observada a presença de uma membrana basal mais espessa na porção anterior, e mais fina na porção posterior, sendo estas as cápsulas anterior e posterior; adicionalmente verificou-se células epiteliais cubóides na cápsula anterior, na região equatorial e na cápsula posterior (Fig.1a) em todos os grupos avaliados. Avaliações similares às encontradas na literatura, pois observa-se em uma lente normal, uma cápsula mais espessa no polo anterior e progressivamente mais fina no polo posterior (WILCOCK, 2007). Cápsulas anteriores e posteriores caninas, após cultivadas em meios contendo soro e meios livres de soro, foram avaliadas quanto a proliferação das CELs, e constatou-se que as células presentes nas cápsulas apresentavam a aparência cubóide (DAVIDSON *et al.*, 2000). Semelhante ao observado neste estudo, uma vez que as células encontradas nas cápsulas posteriores apresentavam morfologia cubóide, sendo presumidamente células epiteliais proliferadas.

Quatro coelhos não apresentaram celularidade na cápsula posterior no M12 (GL=1, GF=1 e GPEG=2) e cinco no M24 (GL=3; GF=2), como é constatado na Fig. 1b. Esses coelhos possuíam o implante LIO, e tal fato pode ser explicado pela associação do

tratamento instituído nas LIOs, e mas também pela própria presença da LIO, uma vez que ela pode exercer um efeito barreira, impedindo a exposição das CELs ao humor aquoso que é rico em fator transformador β , responsável pela transição epitelial-mesenquimal das CELs (SHIRAI *et al.*, 2004; WEDJE *et al.*, 2004). Salienta-se ainda, que este efeito barreira impede o acesso de nutrientes e fatores de crescimento, resultando na regressão e atrofia CELs que migraram para cápsula posterior (HOLLICK *et al.*, 1998).

CELs migraram e foram observadas na cápsulas posteriores de coelhos submetidos a facoemulsificação e colocação de LIO, avaliados até 7 semanas de pós-operatório, assim como foi observada ausência de CELs na cápsula posterior de um coelho avaliado (NISHI *et al.*, 2007). No presente estudo, observou-se a migração de células epiteliais nas cápsulas posteriores de coelhos avaliados em 12 e 24 semanas de pós operatório.

Um padrão de desenvolvimento da região cortical, ou seja, o recrescimento das fibras lenticulares foi observado em todas as lentes deste estudo, não havendo diferenças entre os grupos avaliados. Alguns autores descrevem a regeneração das fibras lenticulares como parte da patogênese da OCP (AWASTHI *et al.*, 2009; RAJ *et al.*, 2009). A presença do recrescimento foi constatado na colocação HE, e foi possível evidenciar a “regeneração” das fibras lenticulares em todas as amostras dos diferentes grupos avaliados neste estudo; isto deve-se provavelmente a uma particularidade dos coelhos que apresentam um padrão de proliferação e regeneração considerável. Gwon *et al.*, (1993) observaram, após a extração da lente de coelhos adultos, o desenvolvimento de grande recrescimento do córtex lenticular. Este recrescimento foi observado em três semanas de pós operatório no grupo controle e seis semanas no grupo tratado. Além disso, após sete meses de pós operatório, o preenchimento máximo do saco capsular da lente foi observado (GWON *et al.*, 1993). No presente estudo, observou-se este recrescimento completo em 12 semanas de pós operatório em todos os grupos avaliados.

A celularidade na cápsula posterior não apresentou diferença estatística entre os diferentes grupos de tratamento ou momentos de avaliação. No entanto, considerando os escores de mediana e valores mínimos e máximos, observou-se escores menores para celularidade nos GL e GPEG, nos dois momentos de avaliação, quando comparados aos demais grupos. Em lentes caninas contendo LIO, cultivadas em meio contendo soro, observou-se a proliferação celular, no entanto a regressão de densidade celular, presumivelmente por morte celular, também foi observada (DAVIDSON *et al.*, 2000).

Saxby *et al.* (1998) analisando culturas de células epiteliais de cápsulas anteriores e posteriores da lente bovinas e humanas, por 12 semanas, descreveram o crescimento de células epiteliais na cápsula posterior em diferentes meios, com ou sem soro fetal, anteriormente livre deste epitélio. Nas duas espécies, a presença de multicamadas foi sempre maior com o meio contendo soro, atingindo o máximo de 5 e 12 camadas de células, respectivamente, nas cápsulas humana e bovina (SAXBY *et al.*, 1998). Neste estudo, foram observadas multicamadas na cápsula posterior, sendo em média três camadas de células epiteliais em cápsulas posteriores do GC. Os GPEG, GF e GL apresentaram em média uma camada de células epiteliais na cápsula posterior

Na avaliação da espessura da cápsula posterior (Tab. 1), no M12, os GL e GPEG apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em suas espessuras quando comparados ao GC. Em valores numéricos, o GPEG apresentou a menor espessura da cápsula posterior da lente no M12; e ainda GPEG apresentou uma elevação significativa em sua espessura nos diferentes momentos de avaliação. No M24, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, e o menor valor numérico observado foi no GL.

Devido a uma série de avanços, a ocorrência de OCP diminuiu ou pelo menos o seu início foi adiado (SINHA *et al.*, 2013); e com exceção da menor espessura verificada nos GL e GPEG, nos demais tratamentos não foram observados retardo ou diminuição das alterações relacionadas a OCP e descritas por Sinha *et al.* (2013). Diferente de Werner *et al.* (2004) e Awasthi *et al.* (2009), que sugerem que as diversas técnicas existentes, com diferentes graus de sucesso, tendem a diminuir a OCP; neste estudo, no M24, a utilização do tratamento à base de plasma de polietilenoglicol e Flúor, não promoveu a redução ou diminuição da OCP.

Coelhos que receberam LIO tratadas com plasma de Flúor apresentaram OCP maior no M12 quando comparadas aos coelhos que receberam LIO tratada com PEG (SERENO, 2012). Além disso, não foram observadas evidências na redução da OCP, na fase inicial, nos coelhos com LIO tratada com plasma de Flúor em relação aos demais tratamentos (SERENO, 2012). No presente estudo, de modo similar, os maiores valores de espessura também foram observados no GF, quando comparados ao GPEG e GL, apesar de não significativo.

Tabela 1. Espessura média da cápsula posterior (espessura CP) em μm , segundo grupo e momentos de avaliação em semanas.

	Grupo	Momento de Avaliação	
		M12	M24
Espessura da cápsula posterior	GL	6,25 (3,99; 10,32) *	6,96 (5,77; 17,89)
	GF	7,91 (6,90; 9,58)	8,15 (6,33; 11,08)
	GPEG	5,80 (5,20; 6,47) ∞ +	11,74 (7,71; 19,31) +
	GC	11,44 (8,27; 21,06) * ∞	8,02 (7,04; 13,45)

Legenda: *, ∞: comparação entre grupos, fixado o momento, sendo $p < 0,05$. + : comparação entre os momentos, fixado o grupo, sendo $p < 0,05$. GL: grupo lente; GF: grupo plasma de Flúor; GPEG: grupo plasma de polietilenoglicol; GC: grupo controle.

O tratamento de superfícies de LIOs acrílicas a partir da polimerização por plasma de PEG reduziu inicialmente o desenvolvimento e a intencidade da OCP após facoemulsificação (SERENO, 2012). Em um estudo usando LIOs acrílicas com superfície modificada com PEG, observou-se formação de OCP, embora significativamente menor durante a terceira e sexta semanas no grupo LIO tratada com PEG (LEE *et al.*, 2007). Neste estudo histológico, pode-se notar o menor valor da espessura no GPEG, e significativo em relação ao GC, indicando uma possível ação inibitória na fase inicial. Desta forma, os dados obtidos no presente estudo, corroboram os de Lee *et al.* (2007), Sereno (2012), os quais concluíram que a modificação da superfície das LIOs acrílicas com PEG pode reduzir a formação de OCP durante a fase precoce. Novos estudos ainda são necessários para avaliar a eficácia e as complicações do uso de fármacos de liberação lenta, como ciclosporina A, inibidores de metaloproteinases (LIU *et al.*, 2013); a partir do presente estudo, pode-se sugerir que a utilização do PEG, com microesferas de liberação lenta, poderia trazer benefícios no retardo do desenvolvimento da OCP, uma vez que ele mostra-se eficaz no controle da OCP numa fase precoce. No entanto, considerando a OCP, nas avaliações finais, não foram encontradas diferenças significativas (LEE *et al.*, 2007; SERENO, 2012). Este mesmo comportamento foi verificado na fase mais tardia, ou seja, sem diferenças entre os grupos avaliados, possivelmente pela ausência de ação inibitória do PEG, indicando que o uso da tecnologia de plasma não impediu a longo prazo a proliferação celular (SERENO, 2012). Salienta-se que o coelho apresenta uma taxa de proliferação muito intensa, não somente no bulbo ocular mas em diversos órgãos e que a avaliação de seis a oito semanas de pós-operatório, corresponderia a aproximadamente dois anos em humanos (WERNER *et al.*, 2004). Neste

experimento, o período final de 24 semanas corresponderia portanto, a um prazo maior em anos e o efeito do plasma de PEG ou demais tratamentos não foram efetivos.

Na avaliação clínica de coelhos submetidos a facoemulsificação e implante de LIO com superfície modificada com plasma de PEG e Flúor, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais quanto aos sinais clínicos como blefarospasmo, fotofobia, secreção ocular, opacidade corneal, pressão intraocular, dentre outras (SERENO, 2012) indicando que os fármacos, o Flúor e PEG, podem seguramente ser utilizados como adjuvante na prevenção da OCP.

Na avaliação da presença de enrugamento na cápsula posterior não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos ou momentos de avaliação, embora a presença de enrugamento capsular posterior tenha sido observado em todos os grupos (Fig. 1c), diferindo apenas na intensidade. O GC apresentou valores de escore mais elevado nos dois momentos em relação aos demais grupos, porém não significativo. Por outro lado, o GPEG apresentou os menores escores no M12, sendo que algumas amostras não apresentaram enrugamento na cápsula posterior (escore 0), em relação aos demais grupos. Wong *et al.* (2004), após cultura de cápsulas posteriores de lentes humanas coletadas para avaliação quanto ao desenvolvimento de OCP, também observaram, no décimo dia de avaliação, a presença evidente de uma camada de células epiteliais na cápsula posterior, bem como a presença de rugas. Esses enrugamentos descritos são portanto similares aos observados em todos os grupos deste estudo.

Foram observadas a presença de vacuolizações (Fig. 1d) no material lenticular em todos os grupos, sendo verificado em maior número, por ordem decrescente, no grupo GF (80%), GPEG (66,66%), no GL (50%), GC (25%). Fernandez *et al.* (2004) também observaram, na análise histológica, a formação de vacuolização nos diferentes tratamentos instituídos para LIOs, ou seja, hialuronato de sódio (SHA), mitomicina C (MMC) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Segundo Fernandez *et al.* (2004), essas vacuolizações representam células lenticulares mortas, necróticas. Estes descrevem ainda, que o grau de vacuolização está relacionada com o grau de desorganização do crescimento das células lenticulares. E ainda que, o aumento da presença de vacuolização no olhos tratados com MMC e nos olhos tratados com EDTA é explicado pelo fato que esses fármacos afetaram a proliferação celular de forma mais eficiente do que a água destilada, por exemplo. No presente estudo, os maiores índices de vacuolização foram

notados também nos grupos de LIO tratados com polietilenoglicol e flúor, e principalmente no M12, sugerindo uma atuação dos fármacos utilizados no tratamento de superfície.

Segundo Davidson *et al.* (2000), cápsulas caninas cultivadas exibiam positividade para alfa-actina, e esta expressão foi vista predominantemente em associação com rugas capsulares. Neste estudo, o marcador alfa-actina foi evidenciado na cápsula posterior dos grupos experimentais (Fig. 2a), porém sem diferenças significativas entre os momentos de avaliação, nem entre os grupos avaliados.

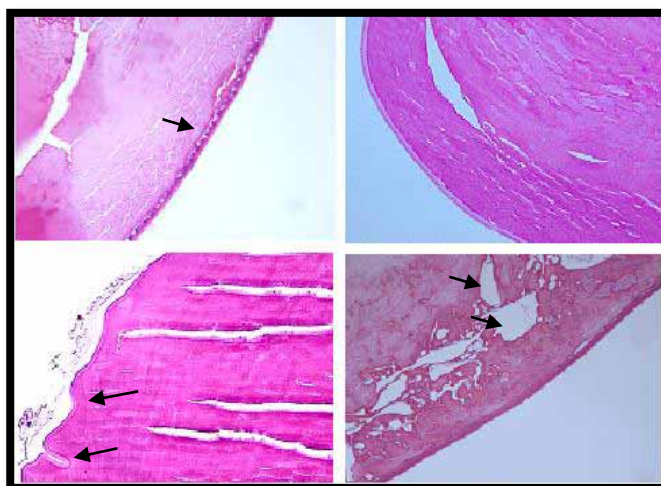


Figura 1a: Fotomicrografia de corte histológico da cápsula posterior, com presença de celularidade (seta), do coelho do grupo controle no M24; 1b: Fotomicrografia de corte histológico da cápsula posterior, livre de celularidade (seta), do coelho do grupo Polietilenoglicol no M12; 1c: Fotomicrografia de corte histológico da cápsula posterior, com enrugamento escore 3 do coelho do grupo controle no M24. Observar enrugamento capsular posterior escore 3; 1d: Fotomicrografia de corte histológico do coelho do grupo plasma de Flúor. Observar a presença de vacuolização (setas). 1a – 1d: HE, 40X.

Paralelamente ao erugamento na cápsula posterior, observou-se que a maioria das cápsulas posteriores positivas para a imunomarcagem de alfa-actina também apresentavam enrugamento nos cortes histológicos, corroborando o descrito por Davidson *et al.* (2000) e Wormstone *et al.* (2009).

Células epiteliais da lente de cápsulas posteriores humana e bovina foram positivas para alfa-actina nas cápsulas cultivadas (SAXBY *et al.*, 1998). Além disso, o alfa-actina é considerado um marcador importante para células contráteis, e tal observação pode

explicar a contração e enrugamento da cápsula posterior (NAGAMOTO *et al.*, 1997; SAXBY *et al.*, 1998). As CELs A são positivas à alfa-actina e promovem a contração e o enrugamento da cápsula posterior (WORMSTONE *et al.*, 2009). O enrugamento descrito também foi observado neste estudo, independente do grupo experimental, corroborando com os achados destes autores.

O anticorpo Ki67, importante marcador de proliferação celular, é expresso em todas as fases do ciclo celular G1, S, G2, no entanto células quiescentes ou na fase G0 não o expressam (HALL e LEVISON, 1990). A imunomarcagem celular para o marcador Ki67 na cápsula posterior foi evidenciada em todos os grupos avaliados (Fig.2b), porém sem diferenças significativas entre os grupos experimentais. Apenas no GL verificou-se uma redução significativa no M12 em relação ao M24, provavelmente devido a maior evidência numérica de proliferação celular no M12, neste grupo experimental (Tab.2). Foram observadas células epiteliais na cápsula posterior nos cortes histológicos, embora algumas amostras tenham sido negativas para este marcador, indicando que estas células não estavam em proliferação, corroborando o descrito Nishi *et al.* (2007), que constataram que células epiteliais da lente estavam presentes na cápsula posterior, embora a grande maioria dos núcleos foram negativos para Ki67, concluindo que estas células estavam na fase G0 do ciclo celular, indicando ausência proliferativa.

No M12, os grupos com LIO tratadas apresentaram menores quantidades de células positivas para o anticorpo Ki67 quando comparado com o grupo LIO sem tratamento, mostrando eficácia do tratamento no controle da proliferação celular.



Figura 2a: Imunomarcagem para alfa-actina na cápsula posterior do coelho do grupo Polietilenoglicol (setas); 2b: Imunomarcagem para Ki67 nas cápsula posterior do coelho do grupo Polietilenoglicol (setas); 2c: Imunomarcagem para vimentina nas cápsula posterior do coelho do grupo Controle (setas). 2a – 2c: aumento 40X

A vimentina foi positiva em todos os grupos (Fig. 2c), e à semelhança dos outros marcadores, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e momentos. Shirai *et al.* (2004) analisaram uma cápsula posterior humana, após procedimento de capsulotomia posterior e Davidson *et al.* (2000) avaliaram amostras de lentes caninas cultivadas, ambos observaram, na análise imunohistoquímica, células positivas para os marcadores vimentina e alfa-actina, dados semelhantes aos encontrados neste estudo.

Tabela 2. Quantidade de células imunomarcadas com Ki67 na cápsula posterior, segundo grupo e momentos de avaliação em semanas.

Variável	Grupo	Momento de Avaliação	
		M12	M24
Quantidade de células (Ki67)			0,0 (0,0; 2,0) *
	GL	2,5 (2,0; 3,0) *	0,0 (0,0; 7,0)
	GF	0,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 1,0)
	GPEG	0,0 (0,0; 3,0)	0,0 (0,0; 1,0)
	GC	1,0 (0,0; 4,0)	0,0 (0,0; 3,0)

*comparação entre momentos, fixado o grupo, sendo $p < 0,05$. GL: grupo lente; GF: grupo plasma de Flúor; GPEG: grupo plasma de polietilenoglicol; GC: grupo controle

Na imunohistoquímica, células epiteliais de cápsulas posteriores foram positivas para vimentina e alfa-actina, confirmando caráter miofibroblástico, sendo estas as células epiteliais da lente que sofreram transformação epitelio-mesenquimal (REYS *et al.*, 1999), o mesmo observado no trabalho em questão.

A vimentina é expressa na maioria das células de origem mesenquimal, incluindo os fibroblastos (SAIKA *et al.*, 1998); assim, a análise imunohistoquímica deste estudo sugere que as células positivas para a vimentina são as células epiteliais da lente remanescentes que sofreram transformação epitelio-mesenquimal, sendo portanto, células epiteliais do tipo A (CELS-A); enquanto as células epiteliais do tipo “E (CELS-E), por apresentarem uma taxa mitótica alta, dando origem a novas fibras continuamente durante a vida (PANDEY *et al.*, 2004), possivelmente tenham sido as células positivas para o marcador Ki67 de proliferação celular. A distribuição das células positivas para vimentina foi uniforme, e estava disposta ao longo da população de células, independentemente da localização na cápsula, enquanto que a expressão para o alfa-

actina foi observada mais evidentemente no saco capsular e em células dentro e adjacentes as pregas e rugas na cápsula posterior (DAVIDSON *et al.*, 2000). Os achados do presente estudo corroboram aos achados em cães, uma vez que as células positivas para vimentina distribuíam-se entre as células epiteliais presentes, tanto na cápsula posterior quanto na cápsula anterior e região equatorial, enquanto as células positivas para alfa-actina, quando presentes, localizavam-se principalmente entre as rugas capsular posterior.

CONCLUSÕES

Com base no estudo conclui-se que o tratamento de lentes intraoculares com plasma de polietilenoglicol e Flúor podem ser realizados como adjuvante na prevenção da opacidade de cápsula posterior, pois não causam alterações na morfologia da lente após a facoemulsificação. Os tratamentos com implante de LIO tratada com plasma de polietilenoglicol ou LIO comercial promovem menor espessura da cápsula posterior com relação a ausência do implante. Considerando as demais variáveis estudadas e avaliação até seis meses, os tratamentos da superfície da LIO a base de plasma de flúor e polietilenoglicol não reduziram o desenvolvimento das alterações histológicas associadas à opacidade de cápsula posterior. Avanços nos processos de tratamento da superfície da LIO com plasma e polimerização de polietilenoglicol devem ser estimulados, objetivando o aumento da permanência do polietilenoglicol no implante.

REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- AWASTHI, N.; GUO, S.; WAGNER, B.J. Posterior capsular opacification a problem reduced but not yet eradicated. *Arch. Ophthalmol.*, v.127, p.555-562, 2009.
- BOZUKOVA, D.; PAGNOULLE, C.; PAUW-GILLET, M.C.; DESBIEF, S.; LAZZARONI, R.; RUTH N.; JEROME, R.; JEROME C. Improved Performances of Intraocular Lenses by Poly(ethylene glycol) Chemical Coatings. *Biomacromolecules*, v.8, p.2379-2387, 2007.
- COLTRO, L.; ALVES, R.M.V. Tratamento superficial de filmes flexíveis por plasma. *Informativo CETEA - Centro de Tecnologia de Embalagem*, v.13, n.2, 2001.
- DAVIDSON, M.G.; WORMSTONE, M.; MORGAN, D.; MALOKOF, R.; ALLEN, J.; MCGAHAN, M.C. Ex vivo canine lens capsular sac explants lens capsular. *Graefe's Archive of Clinical and Experimental Ophthalmology*, v.238, p.708-714, 2000.

- FERNANDEZ, V.; FRAGOSO, M.; BILLOTTE, C.; LAMAR, P.; OROZCO, M.A.; DUBOVY, S.; WILLCOX, M.; PAREL, J.M. Efficacy of various drugs in the prevention of posterior capsule opacification: Experimental study of rabbit eyes. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.30, p.2598–2605, 2004.
- GWON, A.; GRUBER, L.; MANTRAS, C.; CUNANAN, C. Lens regeneration in New Zealand albino rabbits after endocapsular cataract extraction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.34, p.2124–2129, 1993.
- HALL, P.A.; LEVISON, D.A. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *Journal of Clinical Pathology*, v.43, p.184-192 1990.
- HOLLICK, E.J.; SPALTON, D.J.; URSELL, P.G.; PANDE, M.V. Lens epithelial cell regression on the posterior capsule with different intraocular lens materials. *British Journal of Ophthalmology*, v.82, p.1182-1188, 1998.
- KIM, M.K.; PARK, I.S.; PARK, H.D.; WEE, W.R.; LEE, J.H.; PARK, K.D.; KIM, S.H.; KIM, Y.H. Effect of poly (ethylene glycol) graft polymerization of poly (methyl methacrylate) on cell adhesion. *In vitro and in vivo study. Journal of Cataract Refract Surgery*, v.27, p.766 - 774, 2001.
- LEE, H.I.; KIM, M.K.; KO, J.H.; LEE, H.J.; WEE, W.R.; Lee, J.H. The Efficacy of an Acrylic Intraocular Lens Surface Modified with Polyethylene Glycol in Posterior Capsular Opacification. *Journal of Korean Medicine Science*, v.22, p.502-507, 2007.
- LIU, Y.C.; WONG, T.T.; MEHTA, J.S. Intraocular lens as a drug delivery reservoir. *Current Opinion in Ophthalmology*, v.24, p.53-59, 2013.
- NAGAMOTO, T.; EGUCHI, G.; BEEBE, D.C. Control of α -smooth muscle actin expression in cultured lens cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.38, n.43, 1997.
- NISHI, O.; YAMAMOTO, N.; NISHI, K.; NISHI, Y. Contact inhibition of migrating lens epithelial cells at the capsular bend created by a sharp-edged intraocular lens after cataract surgery. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.33, p.1065-1070, 2007.
- PANDEY S.K.; APPLE D.J.; WERNER L.; MALOOF, A.J.; MILVERTON, E.J.; Posterior Capsule Opacification: A Review of the Aetiopathogenesis, Experimental and Clinical Studies and Factors for Prevention. *Indian Journal of Ophthalmology*, v.52, p. 99-112, 2004.

RAJ, S.M.; VASAVADA, A.R.; JOHAR, K.D.; VASAVADA, V.A.; VASAVADA, V.A. Post-operative capsular opacification. *Nepalese Journal of Ophthalmology*, v. 1, cap. 1, p. 43-59, 2009.

REYS, J.A.A.; VEIGA, M.A.L.; SANZ, C.M.; BARRERA, F.M.M.; Abreu GONZÁLEZ, R.A.; ESTÉVEZ, J.J.A. Síndrome de Contracción Capsular: Estudio histopatológico e inmunohistoquímico. *Microcirurgia Ocular*, v.2, 1999.

SAIKA, S.; KAWASHIMA, Y.; MIYAMOTO, T.; OKADA, Y.; TANAKA, S.I.; OHMI, S.; MINAMIDE, A.; YAMANAKA, O.; OHNISHI, Y.; OOSHIMA, A.; YAMANAKA, A. Immunolocalization of prolyl 4-hydroxylase subunits, α -smooth muscle actin, and extracellular matrix components in humans lens capsules with lens implants. *Experience Eye Research*, v.66, p.283-294, 1998.

SAXBY, L.; ROSEN, E.; BOULTON, M. Lens epithelial cell proliferation, migration, and metaplasia following capsulorhexis. *Brithish Journal of Ophtalmology*, v.82, p.945-952, 1998.

SERENO, M.G. *Opacidade de cápsula posterior após implante de lentes intraoculares tratadas por plasma de flúor e polietilenoglicol em coelhos*. 2012. 113f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SHIRAI, K.; SAIKA, S.; OKADA, Y.; ODA, S.; OHNISHI, Y. Histology and immunohistochemistry of fibrous posterior capsule opacification in an infant. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.30, p.523-526, 2004.

SINHA, R.; SHEKHAR, H.; SHARMA, N.; TITIYAL, J.S.; VAJPAYEE, R.B. Posterior capsular opacification: A review. *Indian Journal of Ophtalmology*, V.61, p.371-376, 2013.

WEJDE, G.; KUGELBERG, M.; ZETTERSTRÖM, C. Position of anterior capsulorhexis and posterior capsule opacification. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, v.82, p.531-534, 2004.

WERNER, L.; LEGEAIS, J.; NAGEL, M.; RENARD, G. Evaluation of Teflon-coated intraocular lenses in an organ culture method. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.46, p.347-354, 1999.

WERNER, L.; MAMALIS, N.; PANDEY, S.K.; IZAK, A.M.; NILSON, C.D.; DAVIS, B.L.; WEIGHT, C.; APPLE, D. Posterior capsule opacification in rabbit eyes implanted

with hydrophilic acrylic intraocular lenses with enhanced square edge. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v.30, p.2403-2409, 2004.

WILCOCK, B.P. Eye and ear. In: JUBB; KENNEDY; PALMER'S. *Pathology of Domestic Animals*. 5ed. Elsevier, 2007. chap.04 p.459-543.

WONG, T.T.L.; DANIELS, J.T.; CROWSTON, J.G.; KHAW, P.T. MMP inhibition prevents human lens epithelial cell migration and contraction of the lens capsule. *British Journal of Ophthalmology*, v.88, p.868-872, 2004.

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

ZAR, J.H. Biostatistical analysis, 5ed. New Jersey: Prentice-Hall. 2009. 994p.

ANEXO

Política Editorial

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados. A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação on-line do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.

Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.

Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.

A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.

Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.

Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.

É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.

O ABMVZ comunicará, via eletrônica, a cada autor, a sua participação no artigo. Caso pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”. O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o Webster’s Third New International Dictionary. Para ortografia em português adota-se o Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

O texto NÃO deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.

Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título. Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.
Autores e Filiação. Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco. Nota: 1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação; 2. o texto do artigo em pdf NÃO deve conter o nome dos autores e filiação.

Resumo e Abstract. Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir

os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação. Nota: 1. Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).

Conclusões. As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, SEM revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos. Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, adaptadas para o ABMVZ conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)

dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)

mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al., (1979)

mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al., (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. Am. J. Vet. Res., v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al., Anestesia general del canino. Not. Med. Vet., n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA

VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. Anais... São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota: 1. Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação; 2.O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência e/ou “Aguardando liberação do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação:

Taxa de submissão. A taxa de submissão de R\$50,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da notafiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$95,00, por página impressa em preto e R\$280,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências:

No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.

No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.