

Tenecteplase intracameral durante a facoemulsificação em coelhos: avaliação clínica do segmento anterior e análise bioquímica do humor aquoso

Intracameral tenecteplase during phacoemulsification in rabbits: clinical assessment of the anterior segment and biochemical analysis of the aqueous humor

Lidiane Cândida Piveta^{1*} , Helton Freires Oliveira¹ , Janayne Maria Rezende¹ , Marina Pacheco Miguel¹ , Aline Maria Vasconcelos Lima¹ , Adilson Donizeti Damasceno¹ 

¹Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

*Correspondente – lidiana_piveta@hotmail.com

Seção: Medicina Veterinária

Recebido
17 de março de 2019.
Aceito
4 de dezembro de 2019.
Publicado
16 de junho de 2020.

www.revistas.ufg.br/vet

Como citar - disponível no site,
na página do artigo.

Resumo

Para avaliar o uso da tenecteplase na facoemulsificação transoperatória em coelhos saudáveis, o estudo foi realizado com quinze coelhos da raça Nova Zelândia, divididos em três grupos: grupo controle (CG) grupo não tratado (UG) e grupo tratado (TG). UG e TG foram operados por facoemulsificação e TG recebeu 50 µg / 0,3 mL de tenecteplase intracameral. As avaliações pós-operatórias foram 24 h, 72 h, 7 dias, 15 dias e 21 dias. No TP21 os animais foram submetidos à eutanásia e amostras de humor aquoso foram coletadas. Não foram observadas diferenças significativas nas avaliações clínicas entre o CG e o TG em relação às taxas de incidência de pressão intraocular (PIO), edema de córnea, depósitos de fibrina, hifema, flare aquoso e sinéquia. Na avaliação físico-química do humor aquoso, não houve diferenças significativas entre os três grupos em relação aos valores de pH e concentrações de íons cloreto. Os valores de densidade de humor aquoso foram estatisticamente diferentes entre CG e os outros grupos. Na avaliação histológica, não houve diferenças significativas entre os grupos. O uso da tenecteplase na facoemulsificação transoperatória em coelho não apresentou diferenças significativas em termos de parâmetros clínicos, físico-químicos e histológicos.

Palavras-chave: catarata, fibrina, inflamação ocular, *Oryctolagus cuniculus*, facoemulsificação, tenecteplase.

Abstract

To evaluate the use of tenecteplase in transoperative phacoemulsification in healthy rabbits, the study was carried out with fifteen New Zealand rabbits, divided into three groups: control group (CG), untreated group (UG) and treated group (TG). UG and TG were operated by phacoemulsification and TG received 50 µg / 0.3 mL of intracameral tenecteplase. The postoperative evaluations were 24 h, 72 h, 7 days, 15 days and 21 days. In TP21 the animals were submitted to euthanasia and aqueous humor samples were collected. No significant

differences were observed in the clinical evaluations between CG and TG in relation to incidence rates of intraocular pressure (IOP), corneal edema, fibrin deposits, hyphema, aqueous flare and synechia. In the physicochemical evaluation of the aqueous humor, there were no significant differences between the three groups in relation to pH values and concentrations of chloride ions. The aqueous humor density values were statistically different between CG and the other groups. In the histological evaluation, there were no significant differences between the groups. The use of tenecteplase in transoperative phacoemulsification in rabbits did not present significant differences in terms of clinical, physicochemical and histological parameters.

Keywords: cataract, fibrin, ocular inflammation, *Oryctolagus cuniculus*, phacoemulsification, tenecteplase.

Introdução

A catarata está entre as doenças que mais causam perda da acuidade visual em seres humanos e nos animais domésticos⁽¹⁾. A retirada da lente com catarata é o único tratamento efetivo e a técnica mais utilizada é a facoemulsificação (FACO), devido à rápida recuperação visual e ao menor índice de complicações pós-operatórias^(1,2).

As complicações mais comuns no pós-operatório estão relacionadas com a uveíte e os depósitos de fibrina. A uveíte é um processo inflamatório de partes ou da totalidade da úvea, em consequência da resposta imune a presença de proteínas lenticulares e manipulação tecidual excessiva, causando alterações na produção do humor aquoso, levando à hipotonia do bulbo ocular, vermelhidão, miose, dor, diminuição da transparência corneana, *íris bombé* e, conseqüentemente, hipertensão com glaucoma secundário. A persistência desse processo inflamatório pode levar à formação de sinéquias e glaucoma secundário^(3,4).

A deposição de fibrina na câmara anterior está relacionada com a quebra da barreira hematoaquosa, migração de células inflamatórias e excesso de manuseio das estruturas intraoculares. Conseqüentemente, predispõe à ocorrência das sinéquias, irregularidades pupilares, formação de precipitados ceráticos, alterações na pressão intraocular (PIO) e turbidez do humor aquoso que refletem em dor e baixa acuidade visual^(5,6,7,8).

A uveíte e os depósitos de fibrina estão associados às injúrias teciduais causadas pela manipulação das estruturas intraoculares, o turbilhonamento de fluidos devido ao processo de irrigação, aspiração e emulsificação que podem romper a barreira hematoaquosa (BHA) do bulbo ocular^(7,8). A BHA sob injúria ou estímulos inflamatórios promove a contração do endotélio vascular favorecendo o extravasamento de líquido, células e

proteínas do compartimento vascular para câmara anterior. Como consequência, tem um aumento na celularidade e na presença de fibrina no humor aquoso⁽⁹⁾.

Vários protocolos cirúrgicos e medicamentosos são propostos na tentativa de amenizar as complicações intraoperatórias, responsáveis por gastos adicionais e alterações clínicas aos pacientes. O uso de agentes farmacológicos com aplicação intracameral como a lidocaína 1% sem conservantes, heparina, indometacina, fluorouracil, colchicina, metotrexato⁽⁵⁾ e anti-inflamatórios inibidores seletivo de COX-2 como o celocoxib e rofecoxib⁽¹⁰⁾ e ativadores de plasminogênio teciduais são os mais usados⁽⁶⁾.

Os ativadores de plasminogênio teciduais sintéticos (TPAs) são proteases com atividades fibrinolíticas que atuam na conversão do plasminogênio em plasmina responsável pela degradação da fibrina⁽⁶⁾. São utilizados no tratamento tromboembólico do infarto do miocárdio em humanos pela via intravenosa, quando aplicados via intraocular apresenta a mesma ação de clivar a fibrina e dissolver coágulos sem causar danos ao endotélio corneano^(11,12). Nos tratamentos para dissolução de fibrina⁽¹³⁾ e hifema⁽¹⁴⁾ resultantes de complicações cirúrgicas, alterações vítreas como hemorragias subretinianas, liquefação vítrea e deslocamento vítreo posterior⁽¹⁵⁾, o TPA está entre as drogas de eleição. Na medicina veterinária, o TPA tem sido empregado no transoperatório das cirurgias de cataratas⁽¹⁶⁾, na redução de fibrina e hifema no pós-operatório de cirurgias oculares⁽¹⁷⁾ e na redução do hifema traumático⁽¹²⁾.

O uso de TPA no transoperatório de cirurgia de catarata congênita em humanos e pacientes diabéticos vem sendo relatado como uma medida profilática na prevenção de deposição de fibrina. As sequelas desencadeadas pela presença da fibrina podem ser relacionadas com retardamento da recuperação da acuidade visual dos pacientes, uveítes crônicas e possíveis opacidades da cápsula posterior^(6,18).

A tenecteplase (TNKase) é um TPA de terceira geração que tem um tempo de meia vida maior, apresenta melhor eficácia e segurança, sendo mais seletivo no coágulo já formado que os de primeira e segunda geração de TPAs⁽¹⁹⁾. Contudo, não foram encontrados na literatura consultada informações referentes à aplicação da TNKase intraoperatória na FACO e sua avaliação no pós-operatório imediato. Face ao exposto, propõe-se avaliar o emprego da TNKase no transoperatório de FACO em coelhos hípidos, com vistas a descrever os aspectos relacionados aos parâmetros clínicos e à avaliação físico-química do humor aquoso.

Material e métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (Universidade Federal de Goiás – UFG), protocolo nº. 022/15, e cumpriu as diretrizes para experimentação *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO).

A TNK (Metalyse®, Boehringer-Ingelheim, Itapeverica da Serra / São Paulo (SP) / Brasil) foi processado em uma cobertura de fluxo laminar por diluição com solução salina balanceada (BSS) até atingir uma concentração de 0,05% (50 µg). A solução foi dividida

em alíquotas de 0,1 ml, que foram armazenadas em microtubos em freezer a -80 °C (15). As amostras foram retiradas do freezer no dia do procedimento cirúrgico e mantidas em um refrigerador a -20 °C até o uso, quando foram descongeladas em temperatura ambiente.

Foram utilizados trinta olhos de 15 coelhos albinos da Nova Zelândia machos com idade entre 90 a 160 dias e peso de 2,5 a 3 kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais na Unidade de Experimentação Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ / UFG), com livre acesso a comida e água, ciclo de luz de 12 horas e temperatura de 24 °C.

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos a exames clínicos, oftalmológicos e hematológicos para certificar sua saúde geral e ocular. O exame oftalmológico consistiu na seguinte sequência, sempre realizada pelo mesmo avaliador: teste de Schirmer, avaliação neuro-oftalmológica (resposta à ameaça, teste ofuscante, reflexo palpebral, reflexo fotopupilar direto e consensual), mancha ocular com fluoresceína, tonometria (Tono-Pen Avia® Applanation (Reichert, Buffalo, Nova Iorque, EUA), exame de luz de fenda e oftalmoscopia indireta. Essa sequência do exame oftalmológico foi realizada nos sete dias anteriores à FACO (ponto do tempo – TP 0) e um (TP1), três (TP3), sete (TP7), 15 (TP 15) e 21 (TP 21) dias depois da FACO.

Seis olhos de outros três coelhos, não submetidos ao procedimento cirúrgico, foram utilizados como controle (GC) para avaliação de parâmetros físico-químicos do humor aquoso.

Os animais passaram por período de adaptação com colar elisabetano ao longo de sete dias antes do procedimento cirúrgico, que foi realizado sem jejum prévio. O processo para obtenção da midríase farmacológica iniciou-se uma hora antes da cirurgia e consistiu na utilização de uma gota de colírio de tropicamida a 1% (Mydriacyl®, Alcon, São Paulo/SP/Brasil) e, após quinze minutos, uma gota de colírio de epinefrina a 10% (Fenilefrina 10%®, Allergan, Guarulhos/SP/Brasil).

As medicações pré-anestésicas utilizadas foram 2 mg/kg de morfina por via intramuscular (IM) e 10 mg/kg de cetamina associada a 5 mg/kg de xilazina por via IM. A indução anestésica foi realizada com 2 mg/kg de propofol por via intravenosa (IV), seguiu-se intubação com sonda oro-traqueal nº 3 e manutenção anestésica com isoflurano no circuito aberto. Os pacientes foram, então, posicionados em decúbito dorsal com o plano rostral paralelo ao teto, apoiados em colchão inflável. Com o coelho em plano anestésico e bulbo ocular centralizado, instilou-se uma gota de colírio anestésico a base de proximetacaína a 0,5% sobre a superfície ocular (Anestalcon®, Alcon, São Paulo/SP/Brasil).

Com bisturi 15 graus de 1mm, foi realizada paracentese da câmara anterior em córnea clara entre a posição de 3 e 2 horas. Procedeu-se aplicação intracameral de 0,2ml de azul de Trypan 0,1% (Ophthalmus, São Paulo/SP/Brasil), lavagem com solução salina balanceada (BSS) e preenchimento da câmara anterior com metilcelulose a 2% (Ophthalmus, São Paulo/SP/Brasil). Seguiu-se a incisão principal com bisturi 45 graus de 3,2 mm, entre 9 e 10 horas, em córnea clara; a capsulorrexe foi executada com

a utilização de cistítimo e pinça de Utrata introduzidos pela incisão principal. Após hidrodissecção com BSS e rotação do núcleo lenticular, a caneta do facoemulsificador (Phaco XL[®], Start, Monrovari, Canadá) foi inserida na incisão principal e o núcleo da lente foi esculpido, retirando-se pequenos fragmentos, pelo processo de emulsificação, até obter um anel de córtex no saco capsular. Um gancho de Drysdale (*Chopper*) foi introduzido pela incisão corneana acessória, auxiliando na rotação e manejo dos fragmentos lenticulares, direcionando-os para caneta. O anel de córtex remanescente foi aspirado utilizando-se uma cânula de dupla via. Seguiu-se sutura da incisão principal com dois pontos interrompidos simples com fio Nylon 9-0. Durante todo o procedimento cirúrgico, o bulbo ocular foi irrigado com BSS e a metilcelulose a 2% foi reaplicada para manutenção da câmara anterior.

Os olhos pertencentes ao GT receberam, via paracentese, 0,1 ml de solução de tenecteplase a 0,05% na câmara anterior, imediatamente após a corneorrafia; e os olhos pertencentes ao GNT receberam 0,1 ml de BSS.

No pós-operatório imediato, todos os olhos receberam uma única aplicação de 20 mg de gentamicina associada a 1 mg de dexametasona por via subconjuntival; e aplicação de pomada oftálmica à base de terramicina no saco conjuntival. O protocolo de analgesia pós-operatória consistiu de 4 mg/kg de cloridrato de tramadol por via subcutânea a cada 8 horas por três dias; uma dose de 0,2 mg/kg de meloxicam e duas doses de 0,1 mg/kg de meloxicam com intervalo de 24 horas. Todos os animais receberam uma gota de colírio de tropicamida a 1% a cada 8 horas por três dias e utilizaram colar elisabetano durante os 21 dias de pós-operatório.

O exame do segmento anterior de todos os olhos foi realizado sete dias antes do procedimento cirúrgico (M_0), e no primeiro (M_{1d}), terceiro (M_{3d}), sétimo (M_{7d}), décimo quinto (M_{15d}) e vigésimo primeiro dia (M_{21d}) após a FACO.

O exame oftalmológico consistiu em teste da fluoresceína, anestesia da superfície ocular utilizando o colírio de cloridrato de proximetacaína a 0,5%, tonometria de aplanção (Tonopen Aviavet, Reichert, Estado Unidos) e biomicroscopia com lâmpada em fenda.

Durante o exame de biomicroscopia com lâmpada em fenda, foram avaliadas a córnea, a câmara anterior e a íris. A córnea foi avaliada quanto à presença de opacidade difusa, obedecendo aos escores descritos por Mc Donald e Shadduck⁽²²⁾: 0- ausente, 1- discreta, com boa visibilidade de detalhes da íris, 2- moderada, com baixa visibilidade dos detalhes da íris, 3- grave, com detalhes da íris não visíveis (Tabela 1).

Na câmara anterior foram avaliados a presença de *flare* aquoso e fibrina. Os escores de graduação do *flare* aquoso foram os descritos por Hogan⁽²⁰⁾ 0- ausente, 1- discreto, com boa visibilidade dos detalhes da íris, 2- moderado, com redução da visibilidade dos detalhes da íris, 3- grave, sem visibilidade dos detalhes da íris. Os escores relativos à deposição de fibrina na câmara anterior foram os descritos por Zarei et al.⁽²¹⁾: 0- ausente, 1- discreto, ocupando apenas um quadrante da borda pupilar, 2- moderada, ocupando 2 a 3 quadrantes da borda pupilar, 3- grave, ocupando toda a borda pupilar. Outro parâmetro avaliado foi a presença ou ausência de hifema (Tabela 1).

A íris foi avaliada quanto à inflamação por meio da observação dos sinais hiperemia e

edema. A inflamação da íris foi graduada em escores adaptados dos critérios descritos por Mc Donald e Shaddock⁽²²⁾: 0- ausente, 1- discreta, com hiperemia focal, sem alteração no reflexo de fundo com a retroiluminação; 2- moderada, com hiperemia difusa, com reflexo à retroiluminação reduzido e 3- grave, hiperemia difusa, com perda do reflexo à retroiluminação. Outro parâmetro avaliado foi a presença ou a ausência de sinéquia anterior ou posterior (Tabela 1).

A eutanásia dos coelhos foi realizada no vigésimo primeiro dia pós-operatório. A veia marginal da orelha foi canulada com cateter 24G e foi aplicado 150 mg/kg de pentobarbital (Tiopental sódico, Cristália Prod. Quim. Farm. Ltda., São Paulo/SP/Brasil) e 10 ml de cloreto de potássio a 19,1% (Equiplax Ind. Quim & Farm. Ltda, Aparecida de Goiânia/GO/Brasil).

Após a eutanásia, os animais foram imediatamente submetidos à remoção do bulbo ocular e à colheita de 0,4 ml de humor aquoso por paracentese da câmara anterior. O humor aquoso colhido foi acondicionado em frasco de polipropileno com EDTA e foi homogeneizado com auxílio de uma pipeta e fracionado em alíquotas para análise física e bioquímica.

A análise do humor aquoso ocorreu no Laboratório Multiusuário de Patologia Clínica Veterinária do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG.

A densidade do humor aquoso foi avaliada por refratometria (Ellman BIO 2000®, Bioplus, Barueri/SP/Brasil). O pH das amostras foi verificado pelo método universal, utilizando-se fitas indicadoras. Foram quantificadas a concentração de proteínas totais e de íons cloreto pelo teste colorimétrico (CM 200, Wiener lab Group, Rosário, Argentina).

A avaliação histopatológica foi realizada no Instituto de Patologia e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás IPTSP – UFG.

As estruturas avaliadas foram córnea, corpo ciliar, íris e ângulo de drenagem. As alterações principais observadas foram presença de sinéquia, fibrina, fibrose e hemorragia e graduadas como presente ou ausente. No ângulo de drenagem, foi avaliada a presença/ausência de celularidade e espaçamento celular; nos processos ciliares, avaliou-se a ocorrência de aderências entre as estruturas.

Os testes estatísticos foram realizados com a finalidade de comparação entre GC, GT e GNT; e entre o momento basal (M_0) e os demais momentos (M_{1d} , M_{3d} , M_{7d} , M_{15d} e M_{21d}) em cada grupo.

Os dados foram processados utilizando-se software BioEstat 5.0. As comparações entre grupos e os momentos avaliados, envolvendo variáveis quantitativas (pressão intraocular, pH, densidade e concentração de proteína total e íons cloreto no humor aquoso) foram realizadas por meio de Teste T de *Student*. As variáveis qualitativas quantificadas pelos escores (opacidade corneana, *flare* aquoso, fibrina na câmara anterior e inflamação da íris) foram avaliadas pelo Teste de Kruskal-Wallis e as variáveis binárias quantificadas pela presença ou ausência (infiltrado, hiperemia, hemorragia, edema e fibrina) foram avaliadas pelo teste de Bootstrap – dados dicotômicos e Wilcoxon. Os valores de P

menores que 0.05 ($p < 0.05$) foram considerados estatisticamente significativos.

Tabela 1. Escores de opacidade difusa da córnea, flare aquoso, fibrina e hifema na câmara anterior e inflamação da íris^(17,18,19)

| Paramêtros | Escore | Descrição |
|---------------------------|--------|--|
| Opacidade corneana | 0 | Ausente |
| | 1 | Discreto, com boa visibilidade dos detalhes da íris |
| | 2 | Moderado, com redução da visibilidade dos detalhes da íris |
| | 3 | Severo, sem visibilidade dos detalhes da íris |
| Flare Aquoso | 0 | Ausente |
| | 1 | Discreto, com boa visibilidade dos detalhes da íris |
| | 2 | Moderado, com redução da visibilidade dos detalhes da íris |
| | 3 | Severo, sem visibilidade dos detalhes da íris |
| Fibrina | 0 | Ausente |
| | 1 | Discreto, ocupando apenas um quadrante da borda pupilar |
| | 2 | Moderada, ocupando 2 a 3 quadrantes da borda pupilar |
| | 3 | Severa, ocupando toda a borda pupilar |
| Hifema | + | Presente |
| | - | Ausente |
| Inflamação da Íris | 0 | Ausente |
| | 1 | Discreta, com hiperemia focal, sem alteração no reflexo de fundo com a retroiluminação |
| | 2 | Moderada, com hiperemia difusa, com reflexo à retroiluminação reduzido |
| | 3 | Severa, hiperemia difusa, com perda do reflexo à retroiluminação |
| Sinéquia | + | Presente |
| | - | Ausente |

Resultados

No exame neuroftalmológico, todos os parâmetros observados foram mantidos normais em ambos os grupos, durante todo o experimento. Não foi observada diferença significativa entre os valores de pressão intraocular (PIO) do grupo tratado (GT) e do grupo não tratado (GNT) em nenhum dos momentos avaliados (Tabela 2). Contudo, dentro dos dois grupos, verificou-se aumento significativo da PIO no M_{1d}. Já

em M_{3d} e M_{7d} , os valores da PIO se equipararam aos valores basais em e, em M_{15d} , houve diminuição significativa dos valores de PIO quando comparados aos valores basais (M_0). A PIO finalmente se normalizou em M_{21d} no GT e GNT (Tabela 2).

Houve opacidade corneana difusa no pós-operatório de todos os olhos em ambos os grupos e não se verificou diferença significativa quanto ao escore de opacidade corneana entre os GNT e GT dentro de um mesmo momento. Avaliando o grau de opacidade corneana em diferentes momentos dentro de um mesmo grupo, observou-se maiores graus de opacidade nos momentos M_{1d} , M_{3d} e M_{7d} , com diferença significativa entre o M_{1d} e M_{21d} no GNT (Gráfico 1, Figura 1).

O *flare* aquoso foi observado em ambos os grupos nos escores ausente, discreto e moderado, mas sem diferença significativa entre GNT e GT. Dentro de um mesmo grupo, observou-se no GNT diferença significativa entre M_{1d} e M_{15d} , e entre M_{1d} e M_{21d} . No GT, a diferença em relação a M_0 ocorreu nos tempos M_{1d} e M_{15d} e M_{1d} e M_{21d} (Gráfico 1, Figura 1).

A formação de fibrina foi verificada em ambos os grupos de forma discreta e moderada, sem apresentar diferença estatística entre os grupos e nos diferentes momentos de avaliação clínica (Gráfico 1, Figura 1). Os coágulos de fibrina, quando presentes, estavam localizados próximos à borda pupilar.

A inflamação da íris foi um achado frequente no pós-operatório dos dois grupos avaliados, sem diferença significativa nos escores de inflamação entre os grupos nos mesmos momentos. Comparando-se os momentos avaliados dentro de um mesmo grupo, foi observado um aumento significativo da inflamação, para GNT entre os momentos M_{1d} e M_{21d} e entre M_{3d} e M_{21d} , no GT entre os momentos M_{1d} e M_{21d} e M_{3d} e M_{21d} (Gráfico 1, Figura 1).

Foi verificado hifema em um olho (8,33%) do GNT, relacionado a uma complicação no transoperatório. Houve dificuldade em se obter midríase farmacológica nos olhos do GNT e GT, em todos os momentos pós-operatórios, o que impossibilitou a avaliação da cápsula posterior da lente e do segmento posterior do bulbo ocular.

No pós-operatório dos animais do GNT e do GT, observou-se a ocorrência de sinéquias a partir de M_{1d} até M_{21d} , sendo que 100% dos olhos operados apresentaram as aderências irido-capsulares ou irido-corneanas. Não houve diferença estatística de frequência de sinéquias entre o GNT e GT, sendo observada diferença estatística dentro de um mesmo grupo, entre os momentos M_0 e M_{15d} do GNT, e entre M_0 e M_{15d} e M_{21d} do GT. Em ambos os grupos prevaleceram as sinéquias posteriores.

A Tabela 2 mostra os valores médios de pH, densidade e concentração de íons cloreto (Cl^-) e proteínas totais (PT) no humor aquoso de coelhos hípidos (GC) e de coelhos operados do GT e GNT no M_{21d} .

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão da pressão intraocular (PIO) em coelhos da raça Nova Zelândia submetidos à facoemulsificação tratados com tenecteplase intracameral no transoperatório (GT) e não tratados com tenecteplase intracameral (GNT) Goiânia, GO, 2016. (p<0,05)

| Momentos | PIO (mmHg) | | Valores P | | |
|------------------|----------------------------|----------------------------|-----------|--------|--------|
| | GNT | GT | P* | P** | P*** |
| M ₀ | 12,08 (2,26) | 11,11 (1,65) | 0,13 | | |
| M _{1d} | 25,77 (13,10) ^A | 19,32 (12,79) ^B | 0,20 | 0,0017 | 0,0046 |
| M _{3d} | 11,10 (4,13) | 10,49 (3,24) | 0,64 | 0,335 | 0,59 |
| M _{7d} | 9,92 (2,66) ^A | 9,88 (3,61) | 0,97 | 0,029 | 0,18 |
| M _{15d} | 7,99 (3,61) ^A | 8,05 (3,41) ^B | 0,95 | 0,004 | 0,0018 |
| M _{21d} | 9,27 (3,39) | 9,69 (2,83) | 0,77 | 0,0618 | 1,28 |

*Valores de P entre GNT e GT.

**Valores de P entre o momento M₀ e os demais momentos no grupo GNT.

*** Valores de P entre o momento M₀ e os demais momentos no grupo GT.

Teste t de Student com 5% de significância. Letras maiúsculas iguais demonstram diferença significativa entre o momento M₀ e os demais momentos dentro de um mesmo grupo.

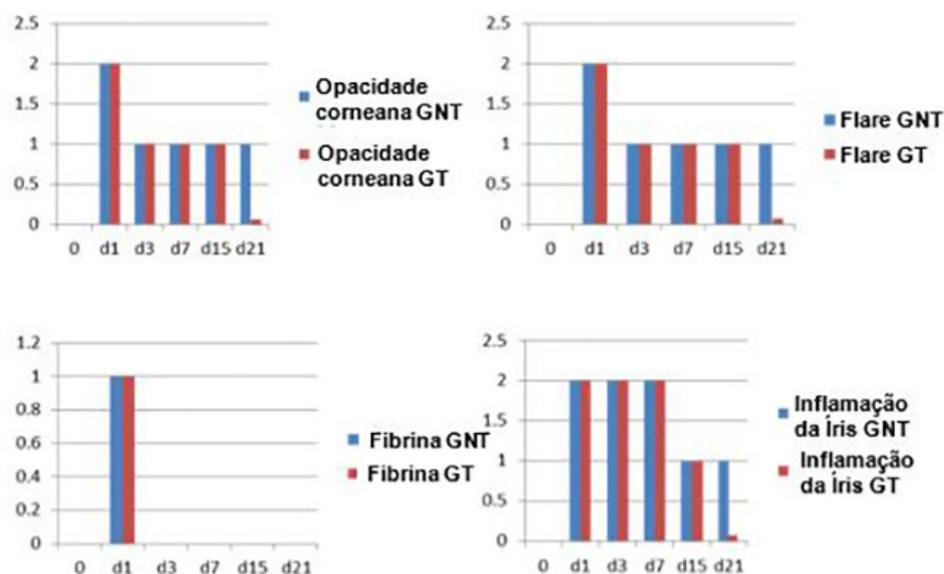


Gráfico 1. Média de opacidade da córnea, flare aquoso, fibrina da câmara anterior e inflamação da íris e imagens representativas dos olhos de coelhos brancos da Nova Zelândia submetidos ao procedimento de facoemulsificação e distribuídos nos grupos UG (grupo não tratado) e TG (grupo tratado com tenecteplase 0,1 ml a 50 µg intracameral intraoperatório) em diferentes momentos da avaliação clínica.

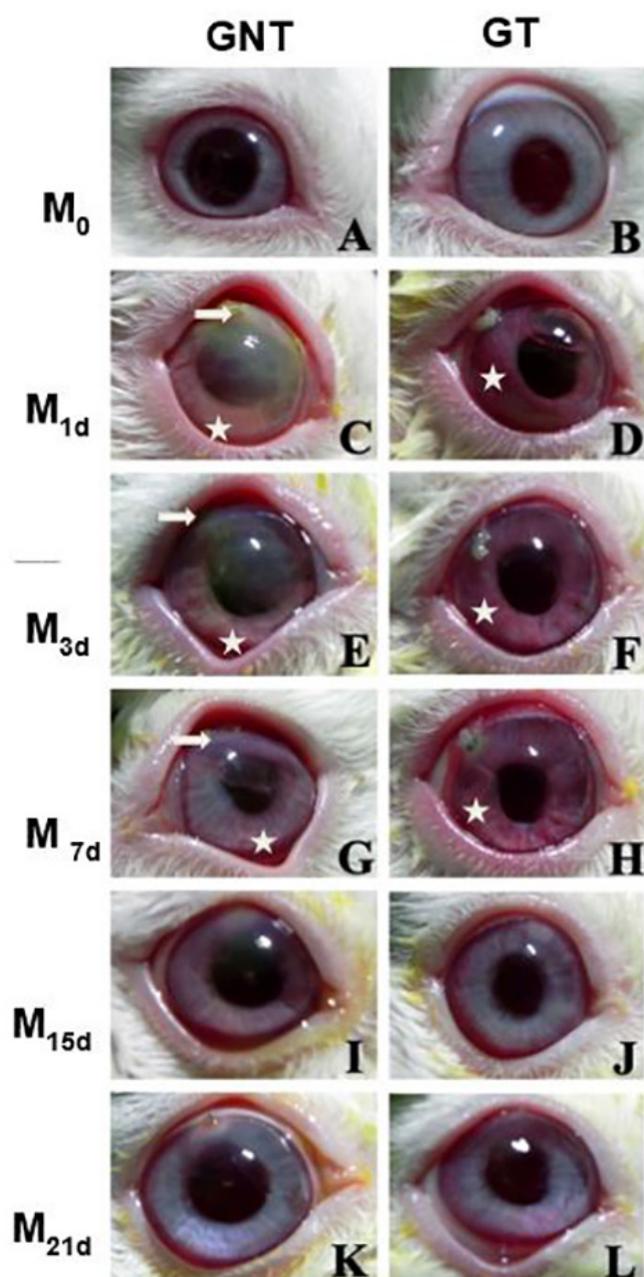


Figura 1. As imagens ilustram os momentos de avaliações clínicas (opacidades corneanas, avaliação da câmara anterior, avaliação da íris) a que os animais foram submetidos. M₀ – período pré-operatório; M_{1d} – primeiro dia de pós-operatório; M_{3d} – terceiro dia de pós-operatório; M_{7d} – sétimo dia de pós-operatório; M_{15d} – décimo-quinto dia de pós-operatório e M_{21d} – vigésimo-primeiro dia de pós-operatório. As setas brancas apontam para área de opacidade corneana e as estrelas indicam área de inflamação da íris identificada pela mudança de coloração em relação à M₀.

Análise bioquímica do humor aquoso

Na tabela 3 o valor médio de pH nos olhos do GC foi $8,0 \pm 0,5$, GNT foi $8,1 \pm 0,54$ e GT foi $8,1 \pm 0,41$ sem diferença significativa entre os valores de pH no humor aquoso dos grupos. A densidade média do humor aquoso nos olhos do GC foi $1,008 \pm 0,0011$, sendo que a densidade foi significativamente maior em GNT $1,010 \pm 0,0018$ e GT $1,031 \pm 0,038$ quando comparados ao GC. Os valores médios da concentração de íons de cloreto (mEq/ml) no GC foi de $170,25 \pm 154,77$, no GNT de $152 \pm 66,33$ e no GT de $177,29 \pm 72,93$, sem diferença significativa entre os grupos. Quanto à quantificação da concentração de PT (mg/dl) no humor aquoso, os grupos GNT ($747 \pm 272,69$) e GT ($995 \pm 667,25$) apresentaram maior concentração de PT que o grupo controle ($55 \pm 30,54$); contudo, entre GNT e GT não houve diferença significativa.

Tabela 3. Valores médios e desvio-padrão do pH, densidade, concentração de íons de cloreto e concentração de proteínas totais no humor aquoso de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, machos, distribuídos nos grupos controle (GC), não tratados (GNT) e grupos tratados (GT) no M_{21d}. Goiânia, GO, 2016

| Parâmetros | GC | GNT | GT | P* | P** | P*** |
|-------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------|---------------------|--------|
| pH | 8 (0,5) | 8,1 (0,547) | 8,1 (0,418) | 0,814 | 0,373 | 0,4282 |
| Densidade | 1,008 ^{AB} (0,0011) | 1,010 ^A (0,0018) | 1,031 ^B (0,038) | 0,034 ^A | 0,0018 ^B | 0,840 |
| Cloreto (mEq/ml) | 170,25 (154,77) | 152 (66,33) | 177,29 (72,93) | 0,273 | 0,075 | 0,148 |
| Proteínas (mg/dl) | 55 ^{AB} (30,54) | 747 ^A (272,69) | 995 ^B (667,25) | 0,023 ^A | 0,0002 ^B | 0,698 |

*Valores de P entre GC e GNT. **Valores de P entre GC e GT. ***Valores de P entre GNT e GT.

Teste T de Student com 5% de significância. Letras maiúsculas iguais demonstram diferença significativa entre os grupos.

Não foi observada diferença estatística entre os grupos avaliados, quanto à presença de sinéquia, fibrina, fibrose, hemorragia, ou celularidade e espaçamento no ângulo de drenagem, nem na presença de aderências das estruturas do corpo ciliar na avaliação histopatológica das estruturas da íris, corpo ciliar e ângulo de drenagem (Tabela 4). O infiltrado inflamatório observado era predominantemente eosinofílico.

Tabela 4. Frequência das alterações histológicas observadas nos bulbos oculares de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, machos, distribuídos nos grupos tratados (GT) e grupo não tratado (GT) no M_{21d}. Goiânia, GO, 2016

| Alterações | GT | GNT |
|-----------------------|--------|--------|
| Sinéquia | 16.76% | 33.40% |
| Fibrina | 49.91% | 83.11% |
| Fibrose | 24.80% | 41.28% |
| Hemorragia | 66.51% | 57.97% |
| Ângulo - celularidade | 75.13% | 50.50% |
| Ângulo - espaçamento | 83.33% | 50.38% |
| Aderência - ciliar | 18.30% | 36.36% |

Discussão

A FACO é a técnica cirúrgica mais usada para o tratamento da catarata por apresentar altos índices de sucesso e ser menos invasiva em relação às outras técnicas^(1,2). Pode-se observar esses índices na recuperação dos animais operados, que passaram por avaliação periódica sem apresentar perda de visão, confirmado pelo teste de ofuscamento positivo desde TP0. Mesmo apresentando vantagens, algumas complicações podem ser observadas nos pós-operatório imediato, como alterações endoteliais corneanas, uveíte e formação de fibrina em câmara anterior,^(3,4,6) as quais foram também observadas neste estudo.

O ativador de plasminogênio tecidual (TPA) é uma das medicações empregadas no transoperatório de catarata congênita em humanos⁽¹⁸⁾, devido aos altos índices de formação de traves de fibrina na câmara anterior e de opacidades capsulares em longo prazo nesses pacientes. A tenecteplase é um TPA de terceira geração que apresenta alta especificidade para fibrina e alta resistência à ação da enzima inibidora do ativador de plasminogênio (PAI 1), secretada pelas plaquetas. Estudos já demonstraram que a tenecteplase tem baixa toxicidade para o endotélio corneano e para a retina de coelhos e humanos^(8,18,23).

Na presente pesquisa, o uso da tenecteplase não influenciou os valores de PIO durante o pós-operatório. De forma semelhante, Heiligenhaus et al.⁽¹³⁾ não observaram influência na PIO após utilização de TPA na FACO em humanos. O pico hipertensivo observado 24 horas após o procedimento cirúrgico foi descrito como uma alteração pós-operatória comum em coelhos. Tal alteração foi relacionada à quebra da barreira hemato-aquosa (BHA), à movimentação excessiva de líquidos no processo de irrigação, à manipulação das estruturas intraoculares e até mesmo à permanência de viscoelástico na câmara anterior^(8,9,24,25). A redução da PIO observada no momento M_{15d} do GNT e do GT, comparativamente ao momento M_0 , provavelmente refletiu o quadro de uveíte pós-operatória. Durante a inflamação uveal, ocorre diminuição na secreção do humor aquoso pelo epitélio do corpo ciliar, o que resulta em hipotensão ocular conforme descrito por Silva et al.⁽²⁶⁾.

A opacidade corneana observada em todos os olhos operados foi atribuída ao edema da córnea, que provavelmente relacionou-se à lesão endotelial. Não houve até o momento relatos de toxicidade endotelial associada ao uso da tenecteplase intracameral em humanos e cavalos^(11,12,18). A lesão do endotélio corneano em olhos submetidos à FACO pode estar relacionada à energia gerada durante a emulsificação, ao turbilhonamento dos fluidos na câmara anterior e à inflamação pós-operatória^(25,27). No presente estudo, acredita-se que a opacidade corneana, observada no GT e no GNT, ocorreu devido a influências inerentes ao procedimento cirúrgico, a despeito da utilização ou não da tenecteplase. A piora da opacidade corneana nos tempos M_{1d} , M_{3d} e M_{7d} coincidiu com os momentos mais críticos de inflamação da íris, o que aponta a uveíte como um fator contribuidor para edema corneano observado nos animais estudados.

O *flare* aquoso foi observado nos pós-operatório do GNT e do GT. De acordo com Koura

et al.⁽⁹⁾, o *flare* aquoso ocorre devido à presença de proteínas plasmáticas e componentes celulares resultantes da uveíte pós-operatória e da quebra da barreira hemato-aquosa. No grupo de olhos que receberam a tenecteplase intracameral, verificou-se que, a partir do M_{15d}, um maior número de olhos apresentou ausência de *flare* aquoso, o que pode refletir uma estabilização da barreira hemato-aquosa e um menor grau de inflamação uveal, como foi sugerido por Tripathi e Tripathi⁽¹⁸⁾ e Escallina et al.⁽²⁸⁾. Estudos adicionais devem ser realizados para melhor definir se a tenecteplase pode influenciar na barreira hemato-aquosa ou na inflamação intraocular.

De acordo com Franco⁽²⁹⁾, a formação de fibrina está associada à lesão tecidual, à migração de células inflamatórias e plaquetas e à liberação de citocinas. O sistema fibrinolítico (plasminogênio-plasmina) é responsável pela dissolução do coágulo de fibrina e sua ativação ocorre quando o t-PA (ativador do plasminogênio do tipo tecidual) converte o plasminogênio em plasmina, que determina a degradação da fibrina. A tenecteplase é um t-PA recombinante, sendo, portanto, um ativador do plasminogênio, convertendo-o em plasmina, que degrada a matriz de fibrina e desfaz o coágulo. Heiligenhaus et al.⁽¹³⁾ e Tripathi e Tripathi⁽¹⁸⁾ relataram uso de TPA intracameral no pós-operatório imediato da FACO em humanos e verificaram a dissolução de coágulos de fibrina. Wu e Wang⁽¹¹⁾ relataram a dissolução de fibrina intraocular com o uso de TPA em humanos com endoftalmites.

Esperava-se uma redução da presença de fibrina nos olhos tratados com tenecteplase, devido à ação fibrinolítica do fármaco. A ausência de diferença na formação de fibrina entre GNT e GT pode estar relacionada à inflamação severa pós-operatória e ao grande estímulo para a formação de fibrina, uma vez que o processo inflamatório e a fibrinogênese são desencadeados por ativadores semelhantes na presença de lesão tecidual⁽²⁹⁾. Nesse panorama, acredita-se que um protocolo pós-operatório anti-inflamatório mais efetivo com uso de fármacos anti-inflamatórios sistêmicos e local poderia ser aplicado em todos os animais operados para que a ação da tenecteplase fosse mais bem avaliada. A avaliação seriada do humor aquoso, por meio da investigação de marcadores específicos para a fibrinólise, como os produtos de degradação da fibrina (PDFs), também poderia auxiliar na avaliação da ação da tenecteplase intracameral, como descrito por Escanilla et al.⁽²⁸⁾. A microscopia especular corneana é aconselhada para melhor avaliação da densidade e morfologia da córnea, determinando, assim, os danos ao endotélio corneano como descrevem Brandão et al.⁽³⁰⁾. Abreu et al.⁽³²⁾ ressaltam a aplicação da Flarimetria a laser para determinar a gravidade e a intensidade do processo inflamatório pela quantificação das células imersas no humor aquoso da câmara anterior dos animais.

A inflamação da íris foi verificada em ambos os grupos e coincidiu com a maior frequência de opacidade corneana e *flare* aquoso. A presença desses sinais de inflamação do segmento anterior é comum após o procedimento de FACO e pode resultar da manipulação de instrumentos próximos à íris, do prolapso da íris através da incisão corneana e da apreensão da íris pela ponteira do facoemulsificador^(25,32).

Escanilla et al.⁽²⁸⁾ preconizaram o uso do TPA no transoperatório da FACO em cães para reduzir a incidência de sinéquias. Contudo, na presente pesquisa, as sinéquias

foram observadas no GT e GNT a partir do primeiro dia pós-operatório e persistiram até o último dia de avaliação clínica. Foi observada uma maior incidência de sinéquias na borda pupilar, local onde os filamentos de fibrina ficavam aderidos com maior frequência, semelhante ao relatado por Heiligenhaus et al.⁽¹³⁾ no pós-operatório de FACO em humanos. Van de Woerdt⁽³¹⁾ e Kohen et al.⁽¹⁵⁾ descreveram a sinéquia como a seqüela mais frequente das uveítes não controladas e propuseram o uso de medicações anti-inflamatórias no pós-operatório como medida profilática.

Os componentes do humor aquoso do coelho são muito semelhantes ao do plasma sanguíneo, diferindo essencialmente na concentração de proteínas totais. Alterações na sua composição foram relacionadas à quebra da barreira hematoaquosa nos casos de injúrias teciduais, cirurgia intraocular e inflamação crônica, pelo extravasamento de células, plaquetas e mediadores da inflamação para o humor aquoso, como descreveram Van de Woerdt⁽³³⁾ e Lorenz et al.⁽³⁴⁾. Na presente pesquisa, os valores de pH do humor aquoso do GC, GT e GNT não diferiram e foram condizentes aos descritos por Becker⁽³⁵⁾. De acordo com Ersan et al.⁽³⁶⁾, as alterações no pH do humor aquoso foram relacionadas com o edema corneano, devido à hipóxia tecidual e à ineficiência das bombas endoteliais.

Observou-se maior densidade no aquoso dos animais do GT e GNT, quando comparados ao GC, o que ocorreu provavelmente em decorrência do processo inflamatório desencadeado pelo procedimento cirúrgico. De forma semelhante, estudos verificaram incremento da densidade no aquoso em casos de inflamação intraocular, o que pode ser consequência da presença de células e de proteínas inflamatórias^(8,34). Comparando os valores médios da concentração de PT entre os grupos, os valores em GNT e GT estavam acima de parâmetros do GC. Liu⁽⁸⁾ e Lorenz et al.⁽³⁴⁾ consideraram a concentração de proteínas totais como indicador de inflamação intraocular. McGahan⁽³⁷⁾ relacionou a presença do *flare* aquoso, da hiperemia e edema de íris, com aumento da concentração de proteínas totais no humor aquoso, como foi verificado no presente estudo.

As concentrações de íons cloreto não apresentaram diferenças estatisticamente significante entre os grupos. Mauri et al.⁽³²⁾ descreveram a participação de íons cloreto na produção de HA e na ativação da anidrase carbônica e, portanto, no controle da PIO. No presente estudo, não foi encontrada correlação entre a PIO e as concentrações de cloreto em HA.

A avaliação do humor aquoso ocorreu em um único momento, 21 dias após o procedimento cirúrgico. Acredita-se que a avaliação seriada, nos dias 1, 3, 7 e 15 pós-operatório, poderia fornecer uma gama de informações a respeito da composição do humor aquoso e permitiria um melhor delineamento dos fenômenos físico-químicos que acontecem na câmara anterior de coelhos submetidos à FACO, com e sem o uso de tenecteplase intracameral.

A avaliação histológica dos bulbos oculares foi realizada apenas no vigésimo-primeiro dia após o procedimento cirúrgico. As alterações observadas como sinéquia, fibrose e aderências nos processos ciliares confirmaram os sinais clínicos observados nos animais, em ambos os grupos, no dia 21, e podem estar relacionados com processo inflamatório crônico.

Conclusão

A utilização de tenecteplase não mostrou influência nos parâmetros bioquímicos do humor aquoso, bem como na pressão intraocular, opacidade corneana, nos sinais de uveíte, na formação de fibrina em câmara anterior e avaliação histopatológica dos bulbos oculares, quando utilizada no transoperatório da FACO em coelhos. Novos estudos são recomendados para avaliação do uso da tenecteplase durante a FACO, em condições de inflamação intraocular controlada.

Agradecimentos

Equipe do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG. Equipe do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular (LFTC) da Faculdade de Farmácia da UFG. Equipe do Laboratório Multiusuário de Patologia Clínica Veterinária do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG. A Prof^a. Marina Pacheco do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG (IPTSP). A Gabriella Czepak Gaston ilustradora científica. E ao CNPq pela bolsa de fomento à pesquisa oferecida para realização desse projeto.

Referências

1. Lim CC, Bakker SC, Waldner CL, Sandmeyer LS, Grahn BH. Cataracts in 44 dogs (77 eyes): A comparison of outcomes for no treatment, topical medical management, or phacoemulsification with intraocular lens implantation. *Can Vet J*, 2011; 52(3): 283-288.
2. Kara-Junior N. A situação do ensino da facoemulsificação no Brasil. *Rev Bras Oftalmol*, 2011; 70(5): 276-8.
3. Grint N. Managing acute pain in dogs. *In Practice*, 2017; 39: 346-354.
4. Klein H, Krohne S, Moore G. Complicações pós-operatórias e resultados visuais de facoemulsificação em 103 cães (179) olhos: 2006-2008. *Vet Ophthalmol*, 2011; 14(2): 114-120.
5. Dotan A1, Kaiserman I, Kremer I, Ehrlich R, Bahar I. Intracameral recombinant tissue plasminogen activator (r-tPA) for refractory toxic anterior segment syndrome. *Br J Ophthalmol*. 2014; 98(2):252-5.
6. Laus J, Torrecilhas A, Brunelli J, Oriá A, Almeida D, Talieri I. Cirurgias da lente. *Oftalmologia clínica em animais de companhia*. São Paulo: Med Vet; 2008; 155-72.
7. Giannico AT, Lima L, Shaw GC, Russ HHA, Froes TR, Montiani-Ferreira F. Effects of prostaglandin analogs on blood flow velocity and resistance in the ophthalmic artery of rabbits. *Arq Bras Oftalmol*, 2016; 79(1):33-6.
8. Reggi JRA, Hida RY, Hida MM, Nishiwaki-Dantas MC, Suzuki H. Subconjunctival and topical

- application of recombinant tissue plasminogen activator in rabbits. *Arq Bras Oftalmol*, 2015; 78(1):6-9.
9. Hvenegaard, AP, Barros, PSM, Safatle, AMV, Góes, ACA, Eyherabide, AR. et al. Avaliação da composição molecular da cápsula anterior da lente de cães idosos com catarata de alto risco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2016; 36(7) 611-616.
10. Rendle D, Hughes K. Resolution of hyfema following intracameral injection of tenecteplase in a Stock Horse. *Aust Vet J*, 2013; 91(1):31-34.
11. Pena CRK, Jorge PA, Kara-Junior N. Intraocular lenses and clinical treatment in paediatric cataract. *Rev Bras Oftalmol*. 2015; 74 (3): 189-93.
12. Fei P, Jin HY, Zhang Q, LI X, Zhao PQ. Tissue plasminogen activator-assisted vitrectomy in the early treatment of acute massive suprachoroidal hemorrhage complicating cataract surgery. *International J of Ophthalmol*, 2018; 11(1) 170-171.
13. Kroll P, Hesse L. VI. C. Pharmacologic vitreolysis with tissue plasminogen activator. In: Sebag J, editor. *Vitreous: in health and disease*. New York: Springer Science+Business Media; 2014.
14. Patrick S, Hui-Tze C, Wan-Hazabbah WH, Zunaina E, Azhany Y, et al.. Use of recombinant tissue plasminogen activator for treatment of recalcitrant anterior uveitis: A case series. *J Taibah University Medical Sciences*. 2018; 5(13): 483-487.
15. Rowley SA, Vijayasekaran ST, Yu PK, Mcalliste I., Yu D-Yi. Retinal toxicity of intravitreal tenecteplase in the rabbit. *Rev Bras Oftalmol*, 2004; 88(4): 573-578.
16. Kim YJ, Kim JY, Seong S, You YS, Kwon OW, Kim SH. Subretinal Tenecteplase Injection for Submacular Hemorrhage in Age-related Macular Degeneration. *J Retina* 2017; 2(2):60-67.
17. Eaton JS, Miller PE, Bentley E, Thomasy SM, Murphy CJ. Slit Lamp-Based Ocular Scoring Systems in Toxicology and Drug Development: A Literature Survey. *J Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2017; 10(33).
18. Oréfice F, Filho RC, Barboza AL, Oréfice JL, Calucci D. Acquired ocular toxoplasmosis, post-birth ocular toxoplasmosis. *Rev Bras Oftalmol*, 2010; 69(3): 184-207.
19. Zarei R, Azimi R, Moghimi S, Abdollahi A, Amini H, Eslami Y, Fakhraii G. Inhibition of intraocular fibrin formation after infusion of low-molecular-weight heparin during combined phacoemulsification-trabeculectomy surgery. [J Cataract Refract Surg.](#), 2006; 32(11): 1921-1925.
20. Guimarães TG, Honsho CS, Mamede FV, Dias FGG, Paulo OLOH, Jorge AT. Phacoemulsification with intraocular lens implantation in dog: literature review. *Investigação Medicina Veterinária*, 2015; 14: 66-71.
21. Dal D, Sarac O, Toklu Y, Altintas AGK, Cakmak HB, ET AL. The Effect of Perioperative Topical Ketorolac 0.5% on Macular Thickness after Uneventful Phacoemulsification. *J Ophthalmol.*, 2017, 8.
22. Silva MRBM, Jorge EN, Schellini SA. Ciliochoroidal detachment and hypotony following pharmacologic aqueous suppressant - therapy supersensitivity syndrome secondary to aqueous humor suppressants. *Arq. Bras. Oftalmol*, 2000; 63(1): 83-86.

23. Adivitiya & Khasa, Y.P. The evolution of recombinant thrombolytics: Current status and future directions. *Bioengineered*, 2017; 8(4) 331-358.
24. Escanilla N, Leiva M, Monreal L, Rios J, Pena T. Aqueous humor fibrinolytic activity in dogs with cataract. *Vet Ophthalmol*, 2013; 16(6): 409-415.
25. Hackner, S. Pulmonary thromboembolism. In J. Bonagura, & D. Twedt, *Kirk's Current Veterinary Therapy XIV* (pp. 689-697). Missouri: Saunders Elsevier. (2009). Harter, K., Levine, M.M.L., Henderson, S.O. Anticoagulation Drug Therapy: A Review. *West J Emergence Medicine*, n. 16, v. 1, p. 11-17, 2015.
26. Cevik SG, Duman R, Çevik MT, Kivanç SA, Akova-Budak B et al. Comparação da espessura central de córnea estimada por um paquímetro ultrassônico e por um microscópio especular sem contato. *Arq. Bras. Oftalmol.* [online]. 2016; 79(5): 312-314.
27. Sanchez RF, Everson R, Hedley J, Dawson C, Lam R, et al.. Rabbits with naturally occurring cataracts referred for phacoemulsification and intraocular lens implantation: a preliminary study of 12 cases. *Veterinary Ophthalmol.* 2018; 4(21) 399-412.
28. Sen HN, Abreu FM, Louis TA, Sugar EA, Altaweel MM, et al., Cataract Surgery Outcomes in Uveitis: The Multicenter Uveitis Steroid Treatment Trial. *Ophthalmology*, 2016; 1(123) 183-190.
29. Wilson ME, O'Halloran H, VanderVeen D, Roarty J, Plager DA, et al.. Difluprednate versus prednisolone acetate for inflammation following cataract surgery in pediatric patients: a randomized safety and efficacy study. *Eye*, 2016; 30: 1187-1194.
30. Pietrowskaa K, Dmuchowska DA, Krasnicki P, Mariak Z, Kretowski A, et al.. Analysis of pharmaceuticals and small molecules in aqueous humor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2018;159:23-36
31. Ersan I, Arikan S, Toman H, Kara S, Gencer B, Erbas M, Tufan HA, Uzun M. Blood gas analyzer utility in evaluation oxygen kinetics of the aqueous humor. *Arq. Bras. Oftalmol*, 2015; 78(2): 82-84.
32. Mauri AG, Sala L, Airoidi P, Novielli G, Sacco R, et al.. Electro-fluid dynamics of aqueous humor production: simulations and new directions. *J For Modeling IN Ophthalmol.* 2016;1(2)48-58.
33. English, R.; Gilger, B.C. Ocular immunology. In: Gellat, K.N.; Gilger, B.C.; Kern, T.J. *Veterinary Ophthalmology.* 5 (1). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2013; 273-299.
34. Metalyse, INN-TNK - Europa.eu, ec.europa.eu/health/documents/community-register/2016/.../anx_136063_pt.pdf