

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Estudo experimental sobre a contaminação por vírus
no instrumental cirúrgico da facoemulsificação**

TATIANA VANNUCCI GARCIA

RIBEIRÃO PRETO

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

TATIANA VANNUCCI GARCIA

**Estudo experimental sobre a contaminação por vírus
no instrumental cirúrgico da facoemulsificação**

Dissertação apresentada à da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pinto Coelho

RIBEIRÃO PRETO

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Garcia, Tatiana Vannucci

Estudo experimental sobre a contaminação por vírus no instrumental cirúrgico da facoemulsificação. Ribeirão Preto, 2009.

74p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

Orientador: Coelho, Roberto Pinto

1. facoemulsificação; 2. instrumental cirúrgico; 3. contaminação viral.

Apoio Financeiro:

**Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento
de Pessoal de Nível Superior.**

Dedicatória

Aos meus pais, pelo amor incondicional.

Orientador

Prof. Dr. Roberto Pinto Coelho

Meu profundo respeito e admiração por todas as suas contribuições para o meu crescimento acadêmico. Minha eterna gratidão pela oportunidade, por suas orientações e por sua paciência em me ensinar.

Agradecimento Especial

Prof. Dr. Luís Tadeu de Moraes Figueiredo

Meus sinceros agradecimentos pela presteza na orientação e empenho no ensino da Virologia. Meus incansáveis agradecimentos por ter me acolhido no Centro de Pesquisas em Virologia como uma de suas alunas. Ficam minha amizade e minha admiração para sempre.

Agradecimentos

A Deus;

Ao meu marido João Carlos, com muito amor e carinho, por estar sempre ao meu lado;

Ao meu irmão Rodrigo pelo grande incentivo;

À minha prima Marta por ter me acolhido com tanto carinho;

A todos do Centro de Pesquisa em Virologia, em especial à Juliana e à Soraya, que muito me ajudaram nesta pesquisa;

A todos do Laboratório de Cirurgia Experimental (Bete, Sebastião, Carlos), pela disponibilidade para a realização dos experimentos;

A toda a minha família, que torce por mim;

Aos amigos de Ribeirão Preto (Graciela Brum, João Marcello, Sheila de Paula, Willian Queiroz, Denise Myashita), por terem colocado sorrisos durante minha estada na cidade e, em especial, ao amigo Ricardo Mabtum pela indicação;

Às secretárias do Departamento, Amélia, Rita e também Rogério e Edson, pela atenção e ajuda em vários momentos e, em especial à Cecília pela ajuda infinita;

Às enfermeiras do Ambulatório de Oftalmologia, Cristina, Lucélia, Maria Helena e D. Marlene, sempre alegres e prestativas;

Ao Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMRP-USP, pela oportunidade, em especial ao Prof. Dr. Antonio Augusto Velasco e Cruz, à Profa. Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues, ao Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha, ao Prof. Dr. Jayter Silva de Paula e ao Prof. Dr. Rodrigo Jorge.

LISTA DE ABREVIATURAS

%-	porcentagem
~-	aproximadamente
<i>amplicons-</i>	produtos de amplificação
CBO-	Conselho Brasileiro de Oftalmologia
CJD-	Doença de Creutzfeldt-Jakob
CPV-FMRP-USP-	Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
DEPC-	dietilpirocarbonato
DMRI-	Degeneração Macular Relacionada à Idade
dNTPs-	desoxiribonucleotídeos
DTT-	Ditiotreitol
FACO-	Facoemulsificador
h.-	hora
HIV-	Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida
MEM-	meio essencial mínimo
min.-	minuto
pb-	pares de bases
RT-<i>nested</i>-PCR-	reação em cadeia da polimerase com <i>primers</i> internos precedida por transcrição reversa
RT-PCR-	reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa
seg.-	segundo
SUS-	Sistema Único de Saúde
UV-	ultravioleta

Lista de Abreviaturas

VHB-	vírus da hepatite B
VS-	estomatite vesicular
VSV-	vesiculovírus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração esquemática da anatomia do olho humano.....	25
Figura 2: Representação esquemática da espessura capsular.....	25
Figura 3: Desenho esquemático do cristalino seccionado ao longo do eixo óptico.....	27
Figura 4: Padrões de classificação da catarata de acordo com o LOCS III	29
Figura 5: Representação esquemática das zonas anatômicas do cristalino humano usado na classificação da catarata de acordo com o método do Grupo de Pesquisa de Catarata da Cooperativa Americana	30
Figura 6: Desenho esquemático da secção longitudinal da caneta do facoemulsificador	34
Figura 7: Foto da caneta do facoemulsificador	35
Figura 8: Foto do facoemulsificador Universal II	35
Figura 9: Ilustração esquemática do funcionamento do facoemulsificador	36
Figura 10: Desenho esquemático da bomba do facoemulsificador.....	37
Figura 11: Contaminação dos olhos de porco	47
Figura 12: Coleta de material da Câmara anterior	50
Figura 13: Gel de eletroforese da RT-PCR	54
Figura 14: Gel de eletroforese da RT- <i>nested</i> -PCR	55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Resultado das inoculações de vírus *Piry* em diluições decimais, nas ninhadas de camundongos. Informação obtida oito dias após a infecção.....45
- Tabela 2-** Detecção de amplicons de ~130 pb conforme o local coletado. Legenda: C: olhos contaminados (1 a 5); N: olhos não contaminados (1 a 5); CA a: câmara anterior antes da cirurgia; CA ap: câmara anterior após a cirurgia; n: não coletado..56

RESUMO

GARCIA, T. V. **Estudo experimental sobre a contaminação por vírus no instrumental cirúrgico da facoemulsificação.** 74f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Objetivos: Verificar a ocorrência de contaminação pelo vírus *Piry* no instrumental cirúrgico da facoemulsificação através das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase precedida por Transcrição Reversa (RT-PCR) e de Reação em Cadeia da Polimerase com iniciadores internos precedida por Transcrição Reversa (RT-*Nested*-PCR). **Materiais e Métodos:** Foi realizado um modelo experimental utilizando-se quatro olhos de porcos contaminados através de parectese de câmara anterior pelo vírus *Piry* e quatro olhos de porcos não contaminados. Após a contaminação dos olhos de porcos, foram realizadas cirurgias de catarata utilizando-se a técnica de facoemulsificação, alternando-se entre um olho contaminado e outro não contaminado. Entre as cirurgias eram trocados os campos operatórios, as luvas, o bisturi de 2,75mm, as pinças, as agulhas, as seringas, as ponteiras da caneta e o saco coletor do facoemulsificador, mantendo-se a caneta e as vias de irrigação e aspiração. **Resultados:** As reações de RT-PCR não apresentaram resultados satisfatórios e não foram analisados. Nas reações de RT-*Nested*-PCR, todos os olhos contaminados apresentaram resultados positivos (4/4) e todos os não contaminados apresentaram resultados negativos (4/4). No saco coletor, três amostras dos olhos contaminados (3/4) foram positivas e em duas amostras (2/4) de olhos não contaminados também foram positivas; na ponteira, em uma amostra de olhos contaminados (1/4) e em duas amostras de olhos não contaminados (2/4), os resultados foram positivos; na via de irrigação foi positiva uma amostra de olhos não contaminados (1/4) e em nenhuma dos olhos não contaminados (0/4); na via de aspiração foram positivas duas amostras de olhos não contaminados (2/4) e duas de olhos contaminados (2/4); nas amostras das luvas, duas amostras de olhos não contaminados (2/4) e duas de olhos contaminados (2/4) foram positivas; nas amostras dos bisturis, três amostras de olhos contaminados (3/4) foram positivas e em nenhuma dos olhos não contaminados (0/4); duas amostras da câmara anterior dos olhos

não contaminados colhidas após a cirurgia também foram positivas (2/4).

Conclusões: A metodologia de RT-PCR não se mostrou adequada para a identificação de material genético do *Vesiculovirus Piry* neste modelo experimental e, portanto, esses resultados não foram analisados. Ao contrário, a metodologia de RT-*Nested*-PCR mostrou-se adequada. Foi possível detectar a presença de material genético viral por meio da técnica de RT-*Nested*-PCR em todos os níveis pesquisados, demonstrando assim, que todos os componentes do facoemulsificador ficaram contaminados após a cirurgia de catarata de um olho contaminado com o vírus *Piry*. Além disso, em dois olhos não contaminados pode-se detectar a presença de material genético viral após a cirurgia de catarata através da facoemulsificação, demonstrando que em algum momento da cirurgia houve a transmissão de material genético do vírus *Piry* para esses olhos não contaminados.

Palavras-chave: facoemulsificação; instrumental cirúrgico; contaminação viral.

ABSTRACT

GARCIA, T. V. **Experimental study about viral contamination on phacoemulsification instruments.** 74f. Dissertation (Master) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Purpose: It aims to check the incident of contamination through virus *Piry* in the surgical instruments of the phacoemulsification by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and RT-*nested*-PCR. **Materials and Methods:** An experimental model was carried out when 4 pigs' eyes were contaminated through a corneoscleral incision with *Piry* virus and 4 pigs' eyes without contamination. After the pigs' eyes infection, the cataract surgery was performed by phacoemulsification alternating from a contaminated eye to a non-contaminated eye. From one surgery to another, the operating fields, the gloves, the scalpel of 2,75mm, tweezers, the needles, the syringes, the tips and the bag collector of the phacoemulsification machine were exchanged. Just the handpiece and irrigation and aspiration systems were maintained. **Results:** The RT-PCR reactions did not present satisfactory results and were not analyzed. The RT-*nested*-PCR reactions: all the contaminated eyes had positive outcome and all non-contaminated eyes had negative outcome; in the collector bag three samples of the contaminated eyes (3/4) were positive and in 2 samples of non-contaminated (2/4) eyes were also positive; in the tip 1 sample of contaminated eyes (1/4) and in 2 samples of non-contaminated eyes (2/4) the results were positive; in the irrigation system, one sample of not contaminated eyes(1/4) was positive; in the aspiration system, two samples of contaminated eyes (2/4) and two samples of non-contaminated eyes (2/4) were positive; in the gloves' samples were positive in two of non-contaminated eyes (2/4) and two samples of contaminated eyes (2/4); in the scalpels samples three of contaminated eyes (3/4) were positive and 1 none of non-contaminated eyes (0/4); finally, two samples of the anterior chamber of the non-contaminated eyes gathered after the surgery were positive. **Conclusions:** The methodology of RT-PCR did not seem to be appropriated for the genetic identification material of the Vesiculovirus *Piry* in this experimental model. However, methodology of RT-*Nested*-PCR appeared to be appropriated. It was possible to detect the

presence of genetic material viral through the RT-*nested*-PCR technique in all the investigated levels, demonstrating so that all the components of the phacoemulsification machine were contaminated after the cataract surgery from a contaminated eye with the *Piry* virus. Moreover, in two non-contaminated eyes could be detect the presence of genetic material after the phacoemulsification surgery, demonstrating that at one moment of the surgery occurred the transmission of genetic material of the virus *Piry* for these non-contaminated eyes.

Key words: phacoemulsification; surgical instruments; viral contamination.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	23
1.1. O CRISTALINO	24
1.2. A CATARATA.....	27
1.2.1. Classificação	28
1.2.2. Epidemiologia.....	30
1.2.3. Etiologia e Fatores de Risco	31
1.2.4. Diagnóstico.....	32
1.2.5. Indicações Cirúrgicas	32
1.2.6. Tratamento	33
1.2.7. Mutirões de Catarata no Brasil.....	37
1.2.8. Reutilização de Materiais	38
1.3. JUSTIFICATIVAS	38
2- OBJETIVOS	40
2.1. OBJETIVO GERAL	41
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1. MATERIAIS	43
3.1.1. Os Vírus.....	43
3.1.1.1. Preparo da semente viral em cérebros de camundongos recém-nascidos	43
3.1.1.2. Quantificação do vírus Piry na medida Dose Letal para 50% dos animais (LD50), utilizando o Método de Reed & Muench ...	44
3.1.1.3. Preparo da solução viral utilizada na contaminação dos olhos de porco	46
3.1.2. Os Olhos de Porco	46
3.1.3. O Facoemulsificador.....	46
3.2. MÉTODOS	46
3.2.1. Procedimento Experimental	46
3.2.2. Contaminação dos Olhos de Porco.....	46
3.2.3. Procedimento Cirúrgico.....	47
3.2.4. Coleta das Amostras	48
3.2.5. Extração do RNA Viral.....	50
3.2.6. <i>Primers</i>	51
3.2.7. Transcrição Reversa	51
3.2.8. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR	52
3.2.9. <i>Nested-PCR</i>	52
3.2.10. Visualização dos <i>Amplicons</i>	52
4- RESULTADOS	53
4.1. RT-PCR.....	54
4.2. <i>Nested-PCR</i>	55
4.2.1. Amostras da Câmara Anterior Antes da Facoemusificação.....	56
4.2.2. Amostras do Saco Coletor.....	56
4.2.3. Amostras da Ponteira	56
4.2.4. Amostras da Via de Irrigação	57

4.2.5. Amostras da Via de Aspiração	57
4.2.6. Amostras da Luva.....	57
4.2.7. Amostras dos Bisturis de 2,75mm.....	57
4.2.8. Amostras da Câmara Anterior Após a Faciemulsificação dos Olhos não Contaminados	57
5- DISCUSSÃO.....	58
6- CONCLUSÕES.....	64
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
8- ANEXOS.....	73

1. INTRODUÇÃO

Neste estudo fizemos a hipótese de que o facoemulsificador utilizado na cirurgia da catarata pode ser um vetor de transmissão de doenças infecciosas sistêmicas e oculares causadas por diversos microorganismos como vírus, bactérias e príons.

Utilizamos o vírus *Piry* cultivado em laboratório para contaminar os olhos de porco e pesquisamos através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase com *primers* internos precedida por transcrição reversa (RT-*nested-PCR*) a presença de material genético viral em diversas partes do facoemulsificador. E também foi possível avaliar a transmissão de material genético do vírus de um olho contaminado para outro não contaminado.

1.1. O CRISTALINO

O cristalino é a única estrutura intra-ocular transparente, biconvexa que pode alterar sua forma. É um órgão óptico celular fechado numa cápsula elástica, suspenso ao corpo ciliar pelas fibras zonulares que estão ligadas radialmente ao seu equador. Ele está diretamente atrás da íris e dentro da pupila. Limita-se posteriormente com o vítreo e é um tecido isolado dentro do corpo, não possui inervação e suprimento sanguíneo após o desenvolvimento fetal (OLSON, 1978).

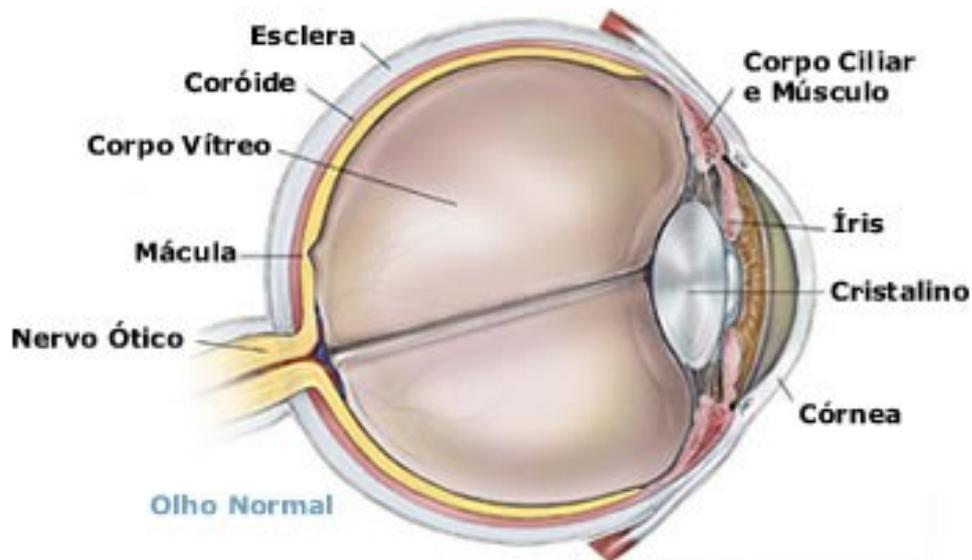


Figura 1: Ilustração esquemática da anatomia do olho humano.

O cristalino é composto de três partes: a cápsula, o epitélio e as fibras celulares que estão dispostas em lamelas.

A cápsula é uma membrana fina, transparente, homogênea, firme e elástica, que envolve o cristalino completamente (OLSON, 1978). A cápsula é a membrana basal do epitélio do cristalino e é também a mais fina do corpo humano. Apresenta-se mais espessa no pólo anterior do que no posterior e as porções anteriores e posteriores são mais espessas em direção à periferia (equador), onde se ligam as fibras do ligamento suspensório (WOLFF, 1997). A espessura da cápsula anterior aumenta desde o nascimento até aproximadamente os 60 anos, mas depois disso diminui discretamente (FISHER, 1969).

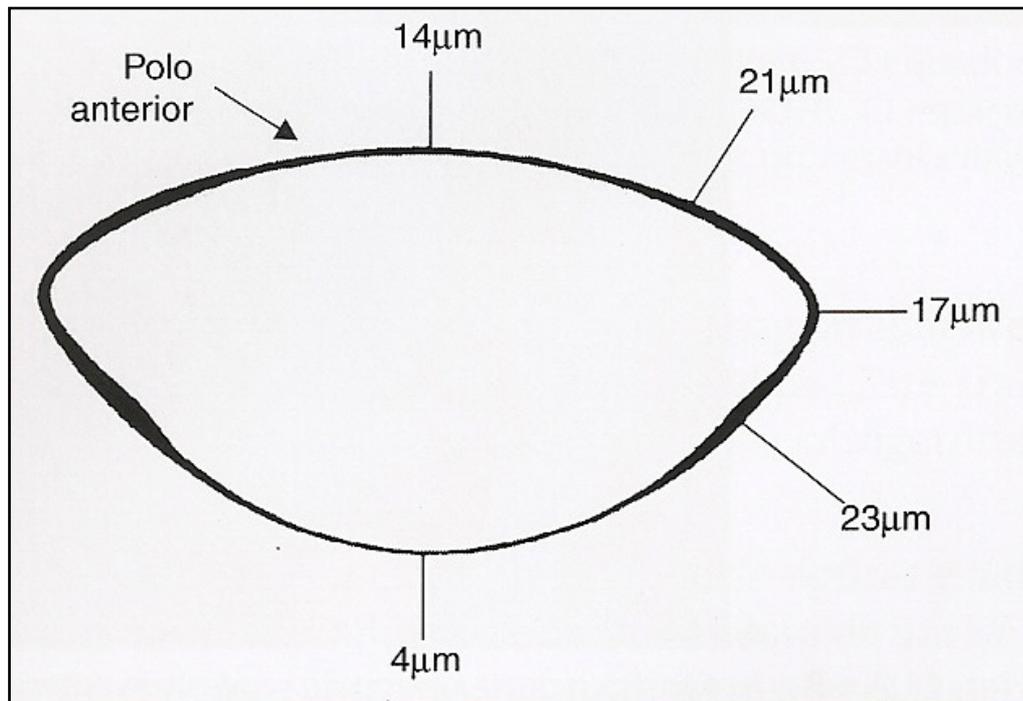


Figura 2: Representação esquemática da espessura capsular.

O epitélio é constituído por uma camada única de células cubóides espalhadas na superfície anterior do cristalino, abaixo da cápsula e com extensão até o equador (WOLFF, 1997). As células jovens migram subsequentemente ao equador onde se tornam fibras do cristalino (OLSON, 1978). Acima do equador está a zona de proliferação, de onde as células migram e iniciam a diferenciação. Grande parte da diferenciação da fibra celular ocorre do equador para dentro e como as células são progressivamente empurradas em direção ao centro do cristalino por fibras recém-formadas, elas entram em contato com outras fibras nas regiões das suturas, tanto via apical como basal, e formam camadas concêntricas firmemente compactadas ao redor das fibras primárias embrionárias que constituem o núcleo (THOLOZAN; QUINLAN, 2007).

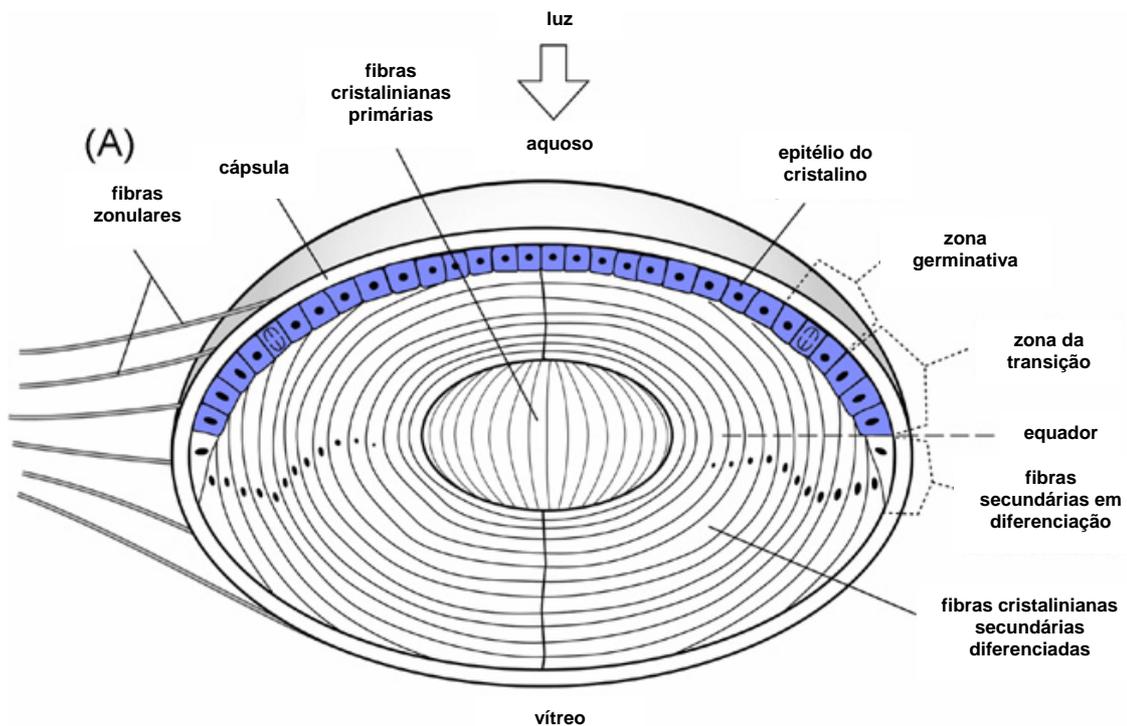


Figura 3: Desenho esquemático do cristalino seccionado ao longo do eixo óptico.

Embora todas as células epiteliais do cristalino sejam capazes de sofrer proliferação celular em um cristalino adulto, essa proliferação ocorre, principalmente, na região acima do equador do cristalino chamada de zona germinativa (ANDLEY, 2008).

1.2. A CATARATA

A catarata pode ser simplesmente definida como qualquer opacidade no cristalino. É a mais comum - e felizmente, uma das mais facilmente tratadas - causa de incapacidade visual e cegueira; de fato, à parte a sua ocorrência como um desenvolvimento anormal e em várias doenças, a catarata senil pode ser vista como uma evidência normal da senescência, ocorrendo em algum grau em 65% das pessoas na sexta década de vida e em mais de 95% acima dos 65 anos de idade (DUKE-ELDER, 1969).

A visão pode se tornar borrada ou embaçada, as cores podem parecer diferentes e as pessoas podem apresentar problemas com ofuscamento à luz do sol ou das lâmpadas, por exemplo, quando estão dirigindo à noite. A maioria das pessoas com catarata, se não tratada, eventualmente, se tornará incapacitada visualmente (DICKSON et al., 1996).

1.2.1. Classificação

Várias classificações clínicas têm sido utilizadas para avaliar a catarata, incluindo o Lens Opacities Classification System (LOCS) III (CHYLACK et al., 1993), the Age-Related Eye Disease Study (AREDS, 2001) e avaliação por Laser na lâmpada de fenda (HALL et al., 1999).

De acordo com o LOCS III, a catarata é classificada de acordo com o local de opacidade do cristalino em: nuclear, cortical e subcapsular posterior e de acordo com a intensidade da opacidade graduada de 1 a 6 para opalescência nuclear e coloração do núcleo e de 1 a 5 para catarata cortical e subcapsular posterior, como podemos observar na Figura 4.

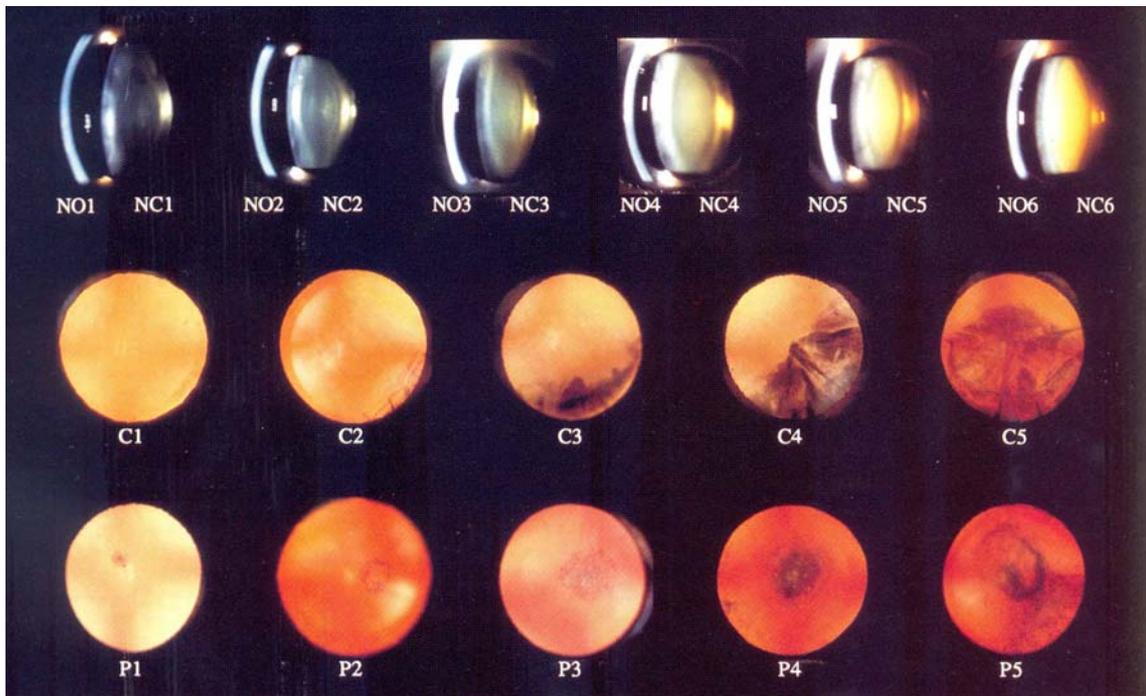


Figura 4: Padrões de classificação da catarata de acordo com o LOCS III, em que NO1 a NO6 e NC1 a NC6 são os padrões para opalescência nuclear e coloração nuclear, respectivamente. C1 a C5 são os padrões para catarata cortical e P1 a P5 são os padrões para catarata subcapsular posterior (CHYLACK et al., 1993).

Cada tipo tem seu conjunto de características e aparências, e dois ou mais tipos podem coexistir simultaneamente (BOLLINGER; LANGSTON, 2008).

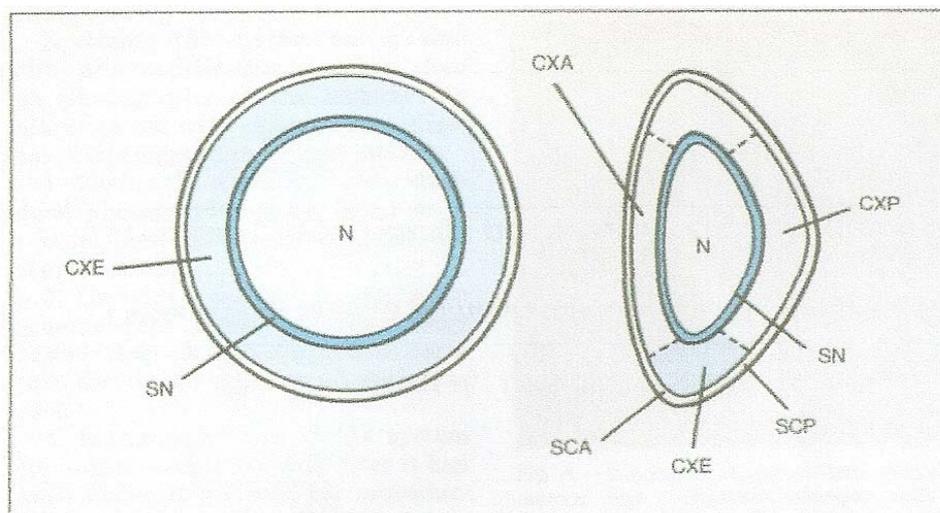


Figura 5: Representação esquemática das zonas anatômicas do cristalino humano usada na classificação da catarata, de acordo com o método do Grupo de Pesquisa de Catarata da Cooperativa Americana. SCA: subcapsular anterior; SCP: subcapsular posterior; CXA: cortical anterior; CXE: cortical equatorial; CXP: cortical posterior; SN: supra nuclear; N: nuclear (CHYLACK et al., 1988).

1.2.2. Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial de Saúde, existem 161 milhões de deficientes visuais em todo o mundo, dos quais 37 milhões são cegos e 124 milhões apresentam baixa visão. Embora a catarata não seja a principal causa de cegueira nos países desenvolvidos, globalmente ela ainda é a causa mais importante, considerando-se quase metade de todos os casos, apesar da melhora dos serviços de cirurgia de catarata em muitas partes do mundo. A catarata relacionada à idade é responsável por aproximadamente 48% da cegueira do mundo, o que representa aproximadamente 18 milhões de pessoas (RESNIKOFF et al., 2004).

Na América Latina, a catarata é a principal causa de cegueira com 41 a 87% dos casos, seguida por doenças do segmento posterior, como glaucoma, retinopatia diabética e Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI), com 7 a 44% (LIMBURG et al., 2008).

Estudos realizados no Brasil relatam que a catarata é a principal causa de baixa acuidade visual e de cegueira, sendo responsável, respectivamente, por

54,90% e 30% dos casos (ARAÚJO FILHO et al., 2008) e, em outro estudo, por 24,6% dos casos de cegueira unilateral, 40,0% dos casos de cegueira bilateral e por 33,2% dos casos de baixa acuidade visual (SALOMÃO et al., 2008).

1.2.3. Etiologia e Fatores de Risco

Já está bem estabelecido que o dano oxidativo às proteínas do centro do cristalino é uma marca da catarata e exerce um papel importante na opacificação do núcleo do cristalino (SPECTOR, 1995). Um recente estudo mostrou que o ascorbato no vítreo diminui a exposição do cristalino ao oxigênio e pacientes com liquefação vítrea, submetidos à cirurgia retiniana ou vitrectomia prévia, estavam associados com diminuição da concentração de ascorbato e baixo consumo de oxigênio, o que pode aumentar a exposição do cristalino ao oxigênio e promover a progressão da catarata nuclear (SHUI et al., 2009).

Inúmeros fatores de risco podem provocar ou acelerar o aparecimento da catarata: medicamentos (esteróides); substâncias tóxicas (nicotina), doenças metabólicas (diabete melito, galactosemia, hipocalcemia, hipertireoidismo, doenças renais); trauma, radiações (ultravioleta (UV), Raios-X e outras); doenças oculares (alta miopia, pseudo-exfoliação); cirurgia intra-ocular prévia (fístula anti-glaucomatosa, vitrectomia posterior); infecções durante a gravidez (toxoplasmose, rubéola) e fatores nutricionais (desnutrição) (CONGDON, 2001).

Dentre outros fatores de risco podemos citar:

- **O grau de escolaridade:** Bochow et al. (1989) relataram que pacientes com grau de escolaridade menor que o ensino médio tinham um risco aumentado para opacidades subcapsulares posteriores;
- **O sexo:** o sexo feminino tem um risco ligeiramente aumentado para desenvolver catarata (CRUICKSHANKS; KLEIN; KLEIN, 1992);
- **Fumo:** vários estudos mostram um aumento do risco de opacidades no cristalino associado ao fumo (WEST et al., 1989; KLEIN et al., 1993) e, em cinco anos de seguimento, houve um aumento no risco de catarata

nuclear e subcapsular posterior naqueles indivíduos que fumavam mais de 20 cigarros ao dia, mas não houve associação para aqueles que fumavam menos de 20 cigarros ao dia (CHRISTEN et al., 1992);

- **Álcool:** um estudo transversal com 4926 adultos, de 43 a 86 anos, em Wisconsin encontrou associação entre usuários crônicos de álcool com catarata severa nuclear, cortical e subcapsular (RITTER et al., 1993);
- **Hipertensão arterial:** no estudo de Framingham, a pressão arterial sistólica se mostrou significativamente maior nos pacientes com catarata quando comparado com indivíduos sem catarata de mesma idade e mesmo sexo (KAHN et al., 1977).
- **Radiação Ultravioleta:** no estudo de Beaver Dam, houve um aumento no risco de opacidades corticais severas associadas à radiação UV no local de residência (CRUICKSHANKS; KLEIN; KLEIN, 1992).

1.2.4. Diagnóstico

A sintomatologia da catarata está essencialmente relacionada a um distúrbio, depois diminuição e finalmente, uma falha na visão. O sinal objetivo da catarata é a presença de opacidades no cristalino (DUKE-ELDER, 1969).

Um minucioso e preciso exame do cristalino necessita de uma ampla dilatação da pupila. A dilatação pupilar, não apenas permite que todo o cristalino seja avaliado em relação às opacidades, mas também a detecção de anormalidades sutis de posição, tamanho e forma do cristalino. A biomicroscopia é, normalmente, o método que fornece mais informações a respeito do cristalino (PHELPS, 1978).

1.2.5. Indicações Cirúrgicas

Em geral, pacientes com catarata relatam um declínio gradual da visão em um período de meses a anos. Pacientes que apresentarem alteração ou diminuição na visão podem ser imediatamente referenciados à cirurgia de

catarata. Em raros casos, a extração da catarata é necessária por causar glaucoma ou uveíte. A cirurgia também é indicada quando o paciente tem alguma patologia no segmento posterior, como a retinopatia diabética, pois o cristalino torna-se tão opaco que dificulta ao oftalmologista examinar a retina claramente. Entretanto, na maioria dos casos, a cirurgia é apenas realizada quando a função visual do paciente diminuiu significativamente (BOLLINGER; LANGSTON, 2008).

1.2.6. Tratamento

Em 1960, a cirurgia de catarata era realizada sob anestesia geral, microscópios não eram utilizados para nenhuma cirurgia oftalmológica em nenhuma parte do mundo (exceto por um cirurgião em Chicago, Richard Peritz), uma incisão de 180 graus e uma iridectomia setorial ampla eram realizadas, e então o cristalino era agarrado por uma pinça e puxado inteiro do olho. Oito ou mais suturas fechavam a incisão, e o paciente permanecia internado por 7 a 10 dias. As pálpebras ficavam inchadas, os olhos vermelhos e irritados por até seis semanas (KELMAN, 2004).

Em 25 de julho de 1967, Banko e Kelman (1967) patentearam um dos mais importantes aparelhos de uso oftalmológico: o facoemulsificador, revolucionário para aquela época, ainda hoje é um dos mais importantes temas de estudos e congressos.

A base da facoemulsificação (faco) envolve três mecanismos: a irrigação, a aspiração e o ultrassom (US). A energia do ultrassom é utilizada para emulsificar o núcleo e, o sistema fluídico (a irrigação e a aspiração) é responsável por remover o cristalino emulsificado através de uma pequena incisão enquanto mantém a câmara anterior.

O aparelho de faco consiste de três partes: a caneta, o corpo do aparelho e o pedal.

A caneta contém, em geral, quatro cristais de quartzo que possuem uma propriedade denominada piezoelétrica, isto é, eles se contraem e expandem

quando estimulados eletricamente, gerando uma vibração ultrassônica. Esse mecanismo de ultrassom faz com que a ponteira conectada à caneta vibre rapidamente para frente e para trás, gerando uma energia mecânica (YOW; BASTI, 1997).

A energia criada é utilizada para conquistar o cristalino e emulsificá-lo. Uma vez emulsificado, o sistema fluídico o remove e o substitui por solução salina balanceada (BSS). Há um delicado balanço entre o poder do facoemulsificador, que tende a empurrar o material cristalino para longe da ponteira, e o fluxo e o vácuo que tende a atrair e segurar o material na ponteira (FISHKIND, 2004).

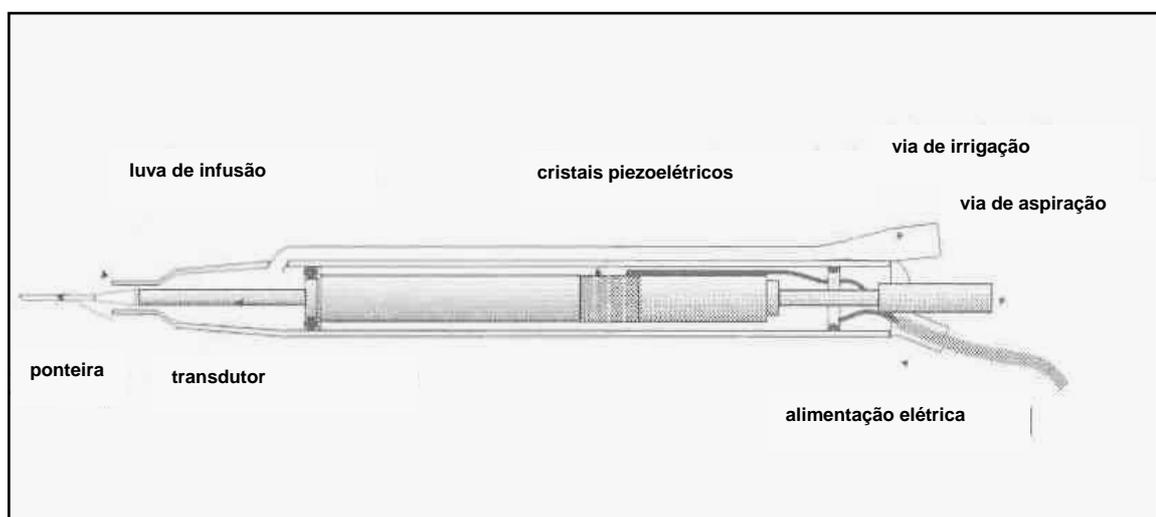


Figura 6: Desenho esquemático da secção longitudinal da caneta do facoemulsificador.



Figura 7: Foto da caneta do facoemulsificador.

O corpo do aparelho é a central de comando, onde encontramos o painel de controle de várias funções, tais como: da potência do ultrassom, do vácuo, do fluxo, além do cauterio bipolar, da vitrectomia e o controle dos sons emitidos pelo aparelho (FARIA, 2000). É também no corpo do aparelho que se encontra a bomba que controla o sistema fluídico. Quando a ponteira não está ocluída, a bomba produz um fluxo na câmara anterior que atrai os fragmentos do cristalino para a ponteira. Quando um fragmento oclui totalmente a ponteira, a bomba produz um poder de apreensão ou vácuo que segura o fragmento para ser emulsificado (SEIBEL, 2004).



Figura 8: Foto do facoemulsificador Universal II®.

O pedal possui três estágios: o primeiro serve para iniciar a irrigação, que ocorre por gravidade e é regulada pela altura da garrafa. No segundo estágio, juntamente com a irrigação, inicia-se a aspiração e esta aumenta simultaneamente à medida que se aproxima do próximo estágio; ao chegar ao terceiro estágio tem-se a irrigação aberta e a aspiração no máximo. Nesse momento, duas situações podem acontecer: faco contínuo (não-linear) ou faco linear. No faco contínuo, ao entrar no terceiro estágio, inicia-se com toda a potência de faco programada. No modo linear inicia-se o terceiro estágio na potência zero de faco e, à medida que se chega ao fim do pedal, atinge-se progressivamente a potência total pré-programada de faco (FARIA, 2000). Além dessas funções, a vitrectomia e o cautério também podem ser acionados pelo pedal.

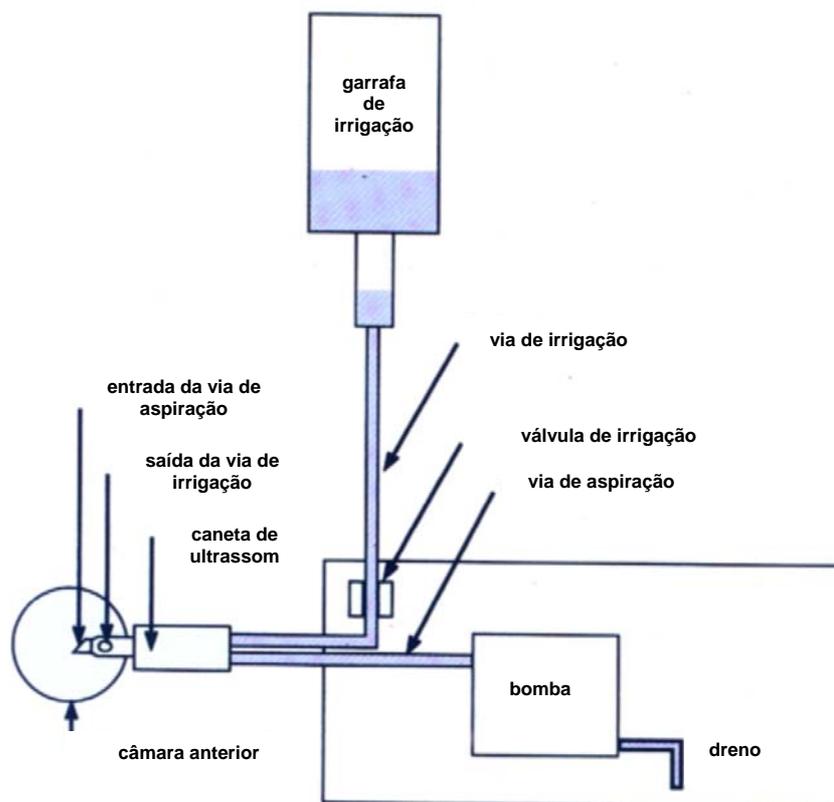


Figura 9: Ilustração esquemática do funcionamento do facoemulsificador.

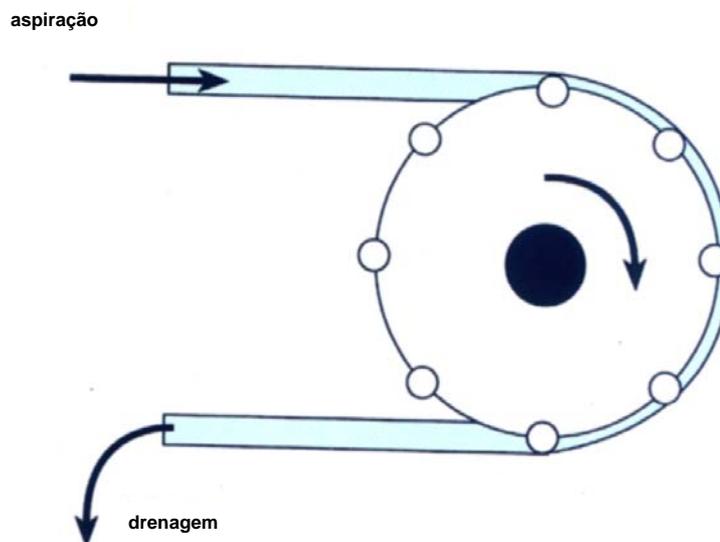


Figura 10: Desenho esquemático da bomba do facoemulsificador.

1.2.7. Mutirões de Catarata no Brasil

De acordo com o relatório apresentado em Brasília no dia 30 de outubro de 2008, durante o III Fórum Nacional de Saúde Ocular, mais de 350 mil pessoas esperam na fila por uma cirurgia de catarata (<http://www.catarata-refrativa.com.br/new/sbcii/load.asp?contentID=94>).

Entre 1999 e 2005, o Ministério da Saúde/SUS (Sistema Único de Saúde), em parceria com o Conselho Brasileiro de Oftalmologia (CBO), promoveram a Campanha Nacional de Cirurgias de Catarata, com o objetivo de eliminar a fila de pessoas cegas ou incapacitadas por catarata no menor prazo possível (www.cbo.com.br/cbo/campanhas_sociais.htm). A partir daí, o número de cirurgias aumentou consideravelmente, sendo que 153 mil procedimentos foram realizados em 1999, 228.200 no ano 2000, 267 mil em 2001, 320 mil em 2002 e, cerca de 316.100 em 2003, abrangendo 700 cidades em todo o território nacional e aproximadamente 1400 instituições de saúde.

1.2.8. Reutilização de Materiais

A Resolução RE nº 2605, de 11 de agosto de 2006 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece a lista de produtos médicos enquadrados como de uso único proibidos de ser reprocessados, dentre eles, no item 29 dessa resolução encontra-se: “Equipos descartáveis de qualquer natureza, exceto as linhas de diálise, de irrigação e aspiração oftalmológicas” (Diário Oficial da União, 2006). Porém, hoje em dia, sabe-se que é prática comum a utilização de apenas um cassete de irrigação e aspiração para a realização de várias cirurgias de catarata num mesmo dia, trocando-se a caneta do facoemulsificador entre as cirurgias e, em outros locais, trocando-se apenas a ponteira da caneta do facoemulsificador.

1.3. JUSTIFICATIVAS

Decidimos realizar este estudo por que:

- A catarata é ainda uma importante causa de cegueira no Brasil.
- Com a ampliação do Projeto Catarata pelo Governo Federal, aumentou-se muito o número de cirurgias realizadas no país, nas quais, muitas vezes, os kits de irrigação-aspiração são reutilizados.
- A preocupação com relação à transmissão de doenças virais, tais como: a hepatite C, hepatite B e a aids nesses mutirões nos fez desenvolver o presente estudo.
- Utilizando um modelo experimental com olhos de porco pesquisamos a contaminação do instrumental da facoemulsificação por um vesiculovírus por meio das técnicas de RT-PCR e de RT-*Nested*-PCR.

- Decidimos pelo *Vesiculovirus Piry*, por ser um vírus facilmente cultivado em laboratório, com altíssima taxa de multiplicação e baixa infectividade e patogenicidade para o homem.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Verificar a ocorrência de contaminação viral nas vias de irrigação e aspiração do aparelho de facoemulsificação utilizado na cirurgia de catarata, bem como em outros instrumentais nela usados.

2. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a ocorrência de contaminação viral pelo *Vesiculovirus Piry* nas vias de irrigação e aspiração do aparelho de facoemulsificação utilizando, para tanto, as técnicas de RT-PCR e RT-*nested*-PCR, e também em outros locais do facoemulsificador como ponteira e saco coletor, e nas lâminas e luvas utilizadas nas cirurgias;
- Verificar a ocorrência de transmissão do material genético do vesiculovírus *Piry*, por RT-PCR e por RT-*nested*-PCR, de um olho de porco contaminado com tal vírus para um olho não contaminado após a facoemulsificação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Os Vírus

Utilizou-se neste estudo o *Rhabdoviridae Vesiculovírus Piry*, cepa BeAn 41191, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu de Moraes Figueiredo do Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CPV-FMRP-USP). Os experimentos de quantificação viral e as RT-*nested*-PCRs também foram desenvolvidos no CPV-FMRP-USP.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP, Proc. nº 051/2008 (Anexo).

3.1.1.1. Preparo da semente viral em cérebros de camundongos recém-nascidos

A semente do vírus *Piry* da estirpe BeAn 41191 foi obtida a partir de macerados do cérebro de camundongos infectados. Para isso, ninhadas de seis camundongos recém-nascidos foram inoculadas pela via intra-cerebral com 200µl de uma semente do vírus *Piry* oriunda do CPV-FMRP-USP. Os animais, acompanhados da mãe para aleitamento e mantidos em gaiolas plásticas, foram observados diariamente até o aparecimento dos sinais de encefalite. Cerca de 48 horas (h) após a inoculação, os animais que não se alimentavam, apresentando dificuldade de movimentação e convulsões foram sacrificados e armazenados a -70°C como fonte de vírus, abundante em seus cérebros.

Os cérebros de dois camundongos infectados pelo vírus *Piry* foram aspirados com auxílio de seringa e agulha obtendo-se um volume de 0,2mL. Ao volume aspirado foi adicionado 3,8mL do meio para cultivo celular de Leibowitz L15, resultando numa semente viral diluída a 1/20, que foi alíquotada e armazenada para uso durante todo o trabalho.

3.1.1.2. Quantificação do vírus Piry na medida Dose Letal para 50% dos animais (LD50), utilizando o Método de Reed & Muench

A LD50 do vírus *Piry* semente foi determinada previamente visando a conhecer as quantidades de vírus que seriam utilizadas para infecção ocular neste estudo. Para tanto, a semente de vírus *Piry* foi diluída com o meio essencial mínimo (MEM) a:

10^{-1} : 0,2 ml semente viral + 1,8ml MEM

10^{-2} : 0,2 ml sol 10^{-1} + 1,8 ml MEM

10^{-3} : 0,2 ml sol 10^{-2} + 1,8 ml MEM

10^{-4} : 0,2 ml sol 10^{-3} + 1,8 ml MEM

10^{-5} : 0,2 ml sol 10^{-4} + 1,8 ml MEM

10^{-6} : 0,2 ml sol 10^{-5} + 1,8 ml MEM

10^{-7} : 0,2 ml sol 10^{-6} + 1,8 ml MEM

10^{-8} : 0,2 ml sol 10^{-7} + 1,8 ml MEM

10^{-9} : 0,2 ml sol 10^{-8} + 1,8 ml MEM

10^{-10} : 0,2 ml sol 10^{-9} + 1,8 ml MEM

Aproximadamente 25 μ L de cada diluição foram inoculados via intracerebral em camundongos de ninhadas com seis camundongos. Essas ninhadas foram observadas diariamente e a mortalidade, bem como a sobrevida, foram determinadas após oito dias de infecção.

Essas informações de mortalidade e sobrevida dos camundongos foram adicionadas a uma tabela (Tabela 1) que permite, com cálculos simples, a determinação da LD50.

Tabela 1: Resultado das inoculações de vírus *Piry* em diluições decimais nas ninhadas de camundongos. Informação obtida oito dias após a infecção.

Diluição viral	Mortos	Vivos	Somatória dos mortos (M*)	Somatória dos sobreviventes (S**)	Razão (M/M+S)	Taxa %
10 ⁻¹	6	0	48	0	48/48	100%
10 ⁻²	6	0	42	0	42/42	100%
10 ⁻³	6	0	36	0	36/36	100%
10 ⁻⁴	6	0	30	0	30/30	100%
10 ⁻⁵	6	0	24	0	24/24	100%
10 ⁻⁶	6	0	18	0	18/18	100%
10 ⁻⁷	6	0	12	0	12/12	100%
10 ⁻⁸	4	2	6	2	6/8	75%
10 ⁻⁹	2	4	2	6	2/8	25%
10 ⁻¹⁰	0	6	0	12	0/12	0

*Somatória de M – de baixo para cima; **Somatória de S – de cima para baixo.

Observou-se na Tabela 1 que a LD50 encontra-se entre as diluições virais 10⁻⁸ (75%) e 10⁻⁹ (25%). Para se determinar a diluição que contém precisamente 1 LD50 foram incluídos dados da taxa % referentes às diluições virais 10⁻⁸ (75%) e 10⁻⁹ (25%) na seguinte fórmula:

$$LD\ 50 = \text{maior \%} - 50 / \text{maior \%} - \text{menor \%}$$

Ou seja,

$$LD50 = 75 - 50 / 75 - 25 = 0,5$$

Portanto, a diluição da semente viral contendo 1 LD50 foi 10^{8,5}, ou seja, a semente viral pura continha 10^{8,5} partículas virais LD50 (690 milhões de partículas virais) nos 25µl que eram inoculados nos cérebros dos animais. Finalmente, transformando para ml, temos 10^{10,1} (27 bilhões e 600 milhões) partículas LD50 do vírus *Piry* por ml da semente viral.

3.1.1.3. Preparo da solução viral utilizada na contaminação dos olhos de porco

A semente de vírus *Piry* foi diluída a 1/10 em meio essencial mínimo (MEM) de cultivo celular visando à infecção dos olhos de porco.

3.1.2. Os Olhos de Porco

Os olhos de porcos utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pelo Frigorífico Pontal Ltda - FRIPON, CNPJ 00.158.835/0001-74, localizado na estrada municipal de Pontal km 0,15, no município de Pontal, macrorregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo.

Após o abate dos animais para fins alimentícios, os olhos eram eviscerados e armazenados em solução fisiológica e gelo, sendo encaminhados ao Laboratório de Cirurgia Experimental da FMRP-USP para a realização do procedimento experimental.

3.1.3. O Facoemulsificador

O aparelho de facoemulsificação utilizado neste estudo foi o Universal II[®] da marca Alcon, gentilmente emprestado pela Alcon Labs[®] do Brasil para este experimento com olhos de porcos.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Procedimento Experimental

Os procedimentos de contaminação dos olhos de porcos e as cirurgias foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental da FMRP-USP. As reações de RT-PCR e RT-nested-PCR foram realizadas no CPV-FMRP-USP.

3.2.2. Contaminação dos Olhos de Porco

Para a contaminação dos olhos de porco foram inoculados, via paracentese corneana, com seringa de insulina, 300µL de solução viral diluída

a 1/10. O procedimento foi realizado em quatro olhos sucessivamente identificados como C2, C3, C4 e C5. Em um olho de porco (identificado como C1) foi inoculado 300 μ L do diluente MEM e esse olho foi utilizado como controle negativo nos experimentos (Figura 11).



Figura 11: contaminação dos olhos de porco

3.2.3. Procedimento Cirúrgico

Após a contaminação dos olhos de porco procederam-se as cirurgias de facoemulsificação. Primeiramente realizava-se a cirurgia em um olho contaminado e, após o término, realizavam-se as coletas das amostras (vide abaixo). Finalizadas as coletas, os campos cirúrgicos eram retirados, bem como o olho operado, trocava-se a ponteira e o saco coletor do facoemulsificador e todos os instrumentos utilizados na cirurgia, tais como pinças, agulhas, seringas, bisturi de 2,75mm e as luvas. Quatro ponteiras e

quatro camisinhas do facoemulsificador foram utilizadas mais de uma vez, pois só haviam seis ponteiras e seis camisinhas para o experimento. Para isso, esse material foi descontaminado com hipoclorito de sódio a 4% durante pelo menos 30 minutos. Um novo olho a ser operado era colocado no campo operatório, dessa vez, um olho não contaminado, identificados como N1, N2, N3, N4 e N5, e assim sucessivamente.

Ordem das cirurgias: C1, N1, C2, N2, C3, N3, C4, N4, C5 e N5.

A técnica cirúrgica realizada foi semelhante à utilizada em seres humanos:

- 1- Primeiramente era realizada a assepsia com Povidine tópico, anti-sepsia e colocação de campos estéreis;
- 2- Incisão em córnea clara com lâmina de 2,75mm;
- 3- Coleta de material da câmara anterior, aproximadamente 200µL através da incisão principal, com seringa e agulha de insulina;
- 4- Capsulorrexise;
- 5- Facoemulsificação, intercalando os estágios de aspiração e ultrassom, durante dois minutos;
- 6- Retirada a caneta do olho, continuava-se a coleta das amostras.

3.2.4. Coleta das Amostras

Foram coletadas amostras em oito locais distintos para pesquisa viral:

- I- Câmara anterior do olho a ser operado, conforme descrito anteriormente (Figura 12).
- II- Lavado da ponteira da caneta de facoemulsificação. A ponteira era lavada com 0,5mL de solução fisiológica de NaCl a 0,9% e esse lavado era armazenado em tubo tipo Eppendorf.
- III- Fluido contido na via de irrigação. Para tanto, a via era desconectada da caneta do facoemulsificador e aspirava-se 0,5mL de solução

fisiológica de NaCl a 0,9% que permanecia nessa via após a cirurgia, com seringa e agulha de insulina.

- IV- Fluido contido na via de aspiração. Essa via era desconectada da caneta do facoemulsificador e conectada a uma seringa de 5mL, que era utilizada na aspiração de 0,5mL de solução fisiológica de NaCl a 0,9% nela contida.
- V- Lavado do bisturi de 2,75mm. Era realizado um lavado com aproximadamente 0,5mL de solução fisiológica de NaCl a 0,9% da lâmina do bisturi de 2,75mm e esse era armazenado em um tubo tipo Eppendorf.
- VI- Lavado da luva. Era realizado um lavado das pontas dos dedos da luva utilizada no ato cirúrgico utilizando aproximadamente 1,0 mL de solução fisiológica de NaCl a 0,9% e esse material era armazenado em tubo tipo Eppendorf.
- VII- Fluido contido no saco coletor do facoemulsificador. Aspirava-se com seringa de 5mL aproximadamente 1,0mL do material contido no saco coletor.
- VIII- Câmara anterior dos olhos não contaminados (N1 a N5) após o término do procedimento cirúrgico.

Essas amostras foram, desde a coleta, conservadas em gelo, sendo, ao final, armazenadas em *freezer* a -70°C até que as reações fossem processadas.



Figura 12: coleta de material da câmara anterior.

3.2.5. Extração do RNA Viral

Para a detecção do RNA viral por RT-PCR e por RT-*Nested*-PCR, inicialmente fez-se a extração do RNA das amostras utilizando o RTP[®] DNA/RNA Virus Mini Kit (INVITEK, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, a 200 μ L da amostra adicionou-se 200 μ L de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O tubo com essa mistura foi incubado em banho Maria por 15 minutos (min.), a 65°C e por 10 min., a 95°C. Adicionaram-se 400 μ L da solução ligante (*binding*) e centrifugou-se a 10000rpm por 1min. Em seguida adicionaram-se 500 μ L da solução R1 do *kit* e novamente centrifugou-se a 10000rpm por 30 segundos (seg.). Adicionaram-se 800 μ L da solução R2 e duas centrifugações foram efetuadas: a 10000rpm por 30 seg. e a 18000rpm por 4 min. Finalizando, 60 μ L da solução R pré-aquecida a 80°C foi adicionada ao filtro e esse foi incubado por 3 min. e centrifugou-se a 10000rpm por 1 min. O produto filtrado proveniente dessa última centrifugação continha o extrato de RNA.

3.2.6. Primers

Os *primers* para uso na PCR e na *nested-PCR*, amplificadores de genoma do vírus *Piry*, foram selecionados por Bonutti e Figueiredo (2005). Esses *primers* amplificam parte do gene da glicoproteína G do vírus *Piry* e produzem produtos de amplificação (*amplicons*) com aproximadamente (~) 290 pares de bases (pb).

Primers da PCR:

G sense	5' - GTC CAC AAT TCA TCG GTG TGG - 3'
G complementar	5' - CAG GTG GTA TGG GCC GAA ATA - 3'

Os *primers* internos utilizados na RT-*nested-PCR* também foram descritos pelos mesmos autores, e produzem *amplicons* com ~130 pb.

Primers da RT-*nested-PCR*:

Piry sense	5' – TCA CTT GGA CCA ACA TTG CC – 3'
Piry complementar	5' – CAT CTG AGA CCG ACA ACA TC - 3'

3.2.7. Transcrição Reversa

A RT, que transforma o RNA genômico viral em DNA complementar para ser, em seguida, amplificado na PCR, foi realizada com 8µL do extrato de RNA da amostra, adicionando 4,0µL de solução tampão cinco vezes concentrada, 1,0µL de transcriptase reversa MMLV (New England Biolabs, EUA), 1,6µL de desoxiribonucleotídeos (dNTPs) (New England Biolabs, EUA), 1,4µL de Ditiotretol (DTT), 1,0µL do *primer* G complementar, 0,5µL de inibidor de RNase (New England Biolabs, EUA) e água tratada com DEPC completando o volume

para 20 μ L. Realizou-se a amplificação seguindo as seguintes temperaturas: 37°C por 1h. e 70°C por 15 min.

3.2.8. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

A PCR foi realizada com 8 μ L do produto da RT (cDNA transcrito) incluindo 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (New England Biolabs EUA), 5,0 μ L de solução tampão 10 vezes concentrada, 4 μ L de dNTPs (New England Biolabs EUA), 1,0 μ L dos *primers* G *sense* e complementar e água tratada com DEPC completando o volume para 50 μ L. Realizaram-se 40 ciclos de amplificação seguindo as seguintes temperaturas: 93°C por 90 seg., 50°C por 120 seg. e 72°C por 240 seg.; ao final de todos os ciclos, 5 min. a 72°C.

3.2.9. *Nested-PCR*

A *Nested-PCR* foi realizada com 1 μ L do produto da PCR, adicionando-se 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (New England Biolabs, EUA), 5,0 μ L de solução tampão 10 vezes concentrada, 1,0 μ L dos *primers* *Piry sense* e complementar e água tratada com DEPC completando o volume para 50 μ L. Realizaram-se 35 ciclos de amplificação seguindo as seguintes temperaturas: 93°C por 90 seg., 50°C por 120 seg. e 72°C por 60 seg.; ao final de todos os ciclos, 5 min. a 72°C.

3.2.10. Visualização dos *Amplicons*

Os *amplicons* obtidos da PCR e da *nested-PCR* foram visualizados em géis de agarose a 2,0%, carregados com 5 μ L da amostra e 2 μ L de corante. Os géis foram submetidos à eletroforese a 100 volts e, em seguida, tratados com solução contendo 0,5 μ g/ml de brometo de etídeo, lavados em água e observados à luz UV. O tamanho dos *amplicons* foi determinado por comparação da linha de migração dos mesmos com as linhas das bandas de um marcador de DNA em escala de 50pb (New England Biolabs, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. RT-PCR

Observou-se que na reação de RT-PCR (Figura 13) não houve amplificação com a presença de produtos com ~290 pb, conforme esperado e demonstrado por Bonutti e Figueiredo (2005).

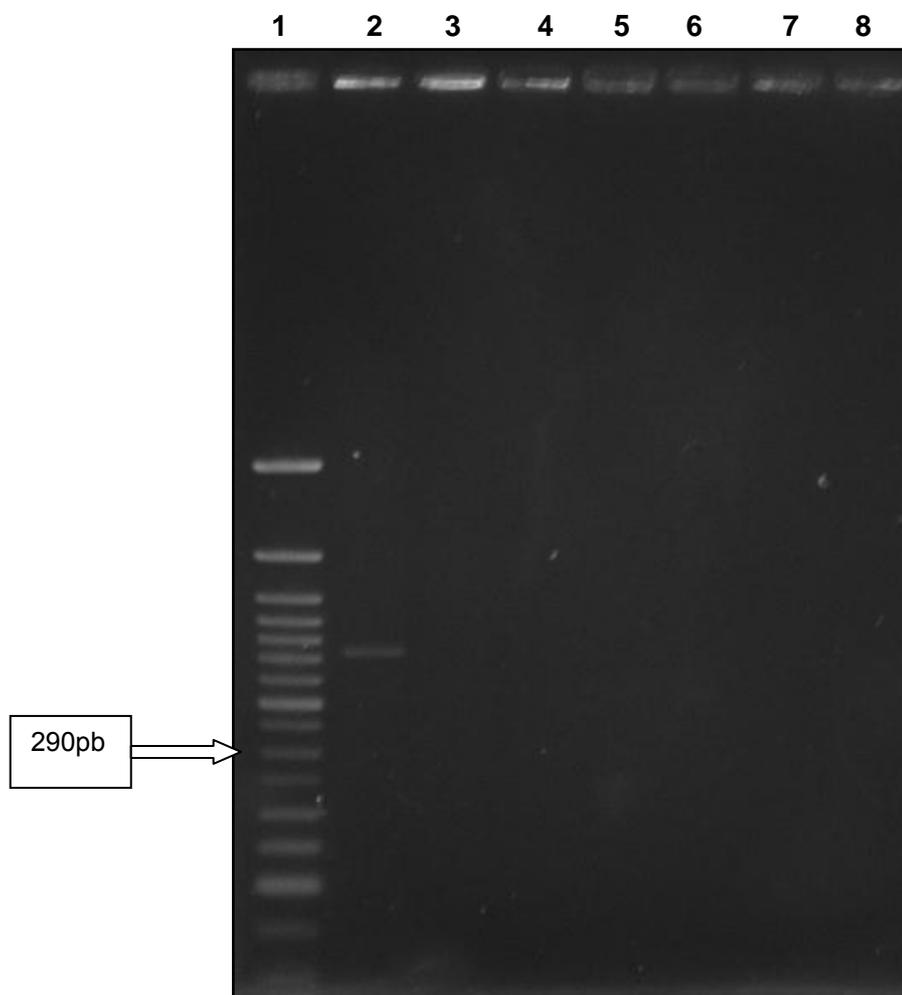


Figura 13: Gel de agarose tratado com brometo de etídeo, mostrando que, após eletroforese, não foram visualizados *amplicons* com 290pb compatíveis com amplificação genômica por RT-PCR do vírus Piry. Sendo: 1: marcador de 50pb; 2: solução viral diluída a 1/10; 3: C3 Câmara anterior antes da cirurgia; 4: C3 aspiração; 5: N3 câmara anterior após a cirurgia; 6: N3 Câmara anterior antes da cirurgia; 7: C3 ponteira; 8: meio MEM.

4.2. *Nested-PCR*

Utilizando a técnica *nested-PCR*, com os *primers* internos, foi possível obter *amplicons* de ~130 pb (Figura 11), conforme demonstrado na Tabela 2.

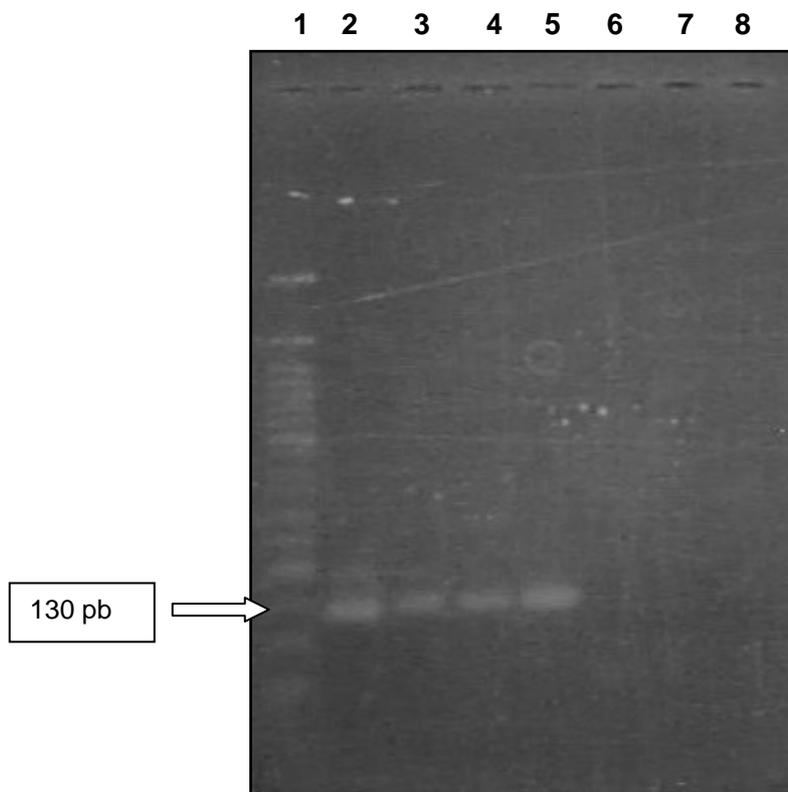


Figura 14: Gel de agarose tratado com brometo de etídeo, mostrando que, após eletroforese, foram visualizados *amplicons* com 130pb compatíveis com amplificação genômica por RT-*nested-PCR* do vírus Piry. Sendo: 1: marcador de 50pb; 2: solução viral diluída a 1/10; 3: C3 Câmara anterior antes da cirurgia; 4: C3 aspiração; 5: N3 câmara anterior após a cirurgia; 6: N3 Câmara anterior antes da cirurgia; 7: C3 ponteira; 8: meio MEM.

Tabela 2: Detecção de amplicons de ~130 pb, conforme o local coletado. Legenda: C: olhos contaminados (1 a 5); N: olhos não contaminados (1 a 5); CA a: câmara anterior antes da cirurgia; CA ap: câmara anterior após a cirurgia; n: não coletado.

		C1	N1	C2	N2	C3	N3	C4	N4	C5	N5
I	CA a	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
II	Saco coletor	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
III	Ponteira	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
IV	Irrigação	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
V	Aspiração	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
VI	Luva	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
VII	Bisturi	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
VIII	CA ap	n	-	n	-	n	+	n	+	n	-

4.2.1. Amostras da Câmara Anterior Antes da Facoemulsificação

Em todos os olhos (4/4) que foram contaminados pelo vírus *Piry* foi possível detectar a presença de *amplicons*, e em todos os olhos não contaminados não foi possível obter os *amplicons*.

4.2.2. Amostras do Saco Coletor

Das amostras do saco coletor coletadas após a cirurgia de olhos contaminados, foi possível detectar a presença de *amplicons* em três (3/4), e em duas (2/4) de quatro olhos não contaminados.

4.2.3. Amostras da Ponteira

Em uma (1/4) amostra de ponteira dos olhos contaminados conseguimos detectar a presença de *amplicons*. Dos olhos não contaminados foi possível detectar a presença de *amplicons* em duas (2/4) amostras.

4.2.4. Amostras da Via de Irrigação

Foi possível detectar a presença de *amplicons* em uma (1/4) amostra de olhos não contaminados e em nenhuma dos olhos contaminados (0/4).

4.2.5. Amostras da Via de Aspiração

Nas amostras de dois (2/4) olhos contaminados e de dois (2/4) olhos não contaminados foi possível detectar a presença de *amplicons*.

4.2.6. Amostras da Luva

Em duas (2/4) amostras de olhos contaminados e em duas (2/4) amostras de olhos não contaminados foi possível detectar a presença de *amplicons*.

4.2.7. Amostras dos Bisturis de 2,75mm

Em três (3/4) amostras dos bisturis de olhos contaminados e em nenhuma amostra (0/4) de olhos não contaminados foi possível detectar a presença de *amplicons*.

4.2.8. Amostras da Câmara Anterior após a Facoemulsificação dos Olhos não Contaminados

Após as cirurgias de facoemulsificação dos olhos não contaminados foram novamente colhidas amostras da câmara anterior. Dos quatro olhos não contaminados operados foram detectados *amplicons* em dois olhos (2/4) através da RT-Nested-PCR.

5. DISCUSSÃO

Técnicas de biologia molecular como a RT-PCR e a RT-*nested*-PCR vêm sendo utilizadas pela comunidade científica oftalmológica para a detecção de partículas virais (RNA e DNA) em diversas partes do olho humano, tais como na córnea (LEE et al., 2001; GARCIA-FERRER et al., 1995), no tecido uveal (SHIMAZAKI et al., 1994), na lágrima (SHIMAZAKI et al., 1994; SU et al., 1994), no humor aquoso (SHIMAZAKI et al., 1994; VERBRAAK et al., 1996; FOX et al., 1991) e no corpo vítreo (FOX et al., 1991; NOGUEIRA et al., 2001; YAMAMOTO; WAKABAYASHI; MURAKAMI, 2002).

A transmissão do vírus da raiva através de transplante de córnea foi primeiramente descrita em 1979 (HOUFF et al., 1979). Segundo dados americanos do “Morbidity and Mortality Weekly Report” (MMWR) do “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC), 16 casos de raiva foram descritos após transplantes de órgãos, dentre eles, oito casos após transplante de córnea (<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr57e507a1.htm>). Outros estudos também relatam a transmissão de outros microorganismos após transplante de córnea, como o príon da Doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) e o vírus da hepatite B (VHB). Uma revisão da literatura relata cinco casos de transmissão da CJD através de transplante de córnea (LANG, HECKMANN, NEUNDÖRFER, 1998).

Em relação ao vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), dois relatos de transplantes de córnea de doadores infectados foram encontrados (SCHAWRZ et al., 1987; PEPOSE et al., 1987), porém nenhum dos sete pacientes dos estudos (3 receptores no primeiro e 4 no segundo) apresentaram soro-conversão até a publicação.

Hoft et al. (1997) publicaram dois casos de infecção pelo vírus VHB após ceratoplastia penetrante em que a história clínica e os testes sorológicos dos dois receptores sugerem fortemente que a infecção nos dois casos foi adquirida do tecido corneano doador (HOFT et al., 1997).

Não encontramos na literatura relatos de casos ou estudos com modelos experimentais que demonstrassem a transmissão de doenças virais em cirurgias de catarata.

A cirurgia da catarata alcançou desenvolvimento e eficiência tamanhos, que um cirurgião habilidoso, com equipe treinada e aparelhos sofisticados, realiza uma cirurgia em torno de cinco a dez minutos. Em menos de 50 anos de existência da facoemulsificação, a oftalmologia mundial presenciou a evolução dos aparelhos de faco, bem como de outros insumos a ela relacionados, como as lentes intraoculares (LIO), os bisturis, os viscoelásticos, as pinças, os dobradores e injetores de LIOs, e o aparecimento dos cassetes de irrigação e aspiração. Todos esses avanços tecnológicos trouxeram também um aumento no custo da cirurgia de catarata, tanto para o cirurgião, como para o paciente.

Citando Paulo César Fontes e Eloim G. de Andrade (Capítulo 22 “As diferentes máquinas e características principais”, na página 219 do livro “Catarata” de Miguel Padilha, 2003): “Evidentemente que, em um país em desenvolvimento como o nosso, a tecnologia de descartáveis (que encarece os procedimentos) não é olhada com simpatia, daí o grande mercado que se abre ao equipamento Universal II[®]. Trata-se, a meu ver, de máquina bastante robusta e eficiente, mas definitivamente não oferece os recursos de segurança e alternativas dos equipamentos mais sofisticados e que usam os cassetes descartáveis”.

Pensava-se que os custos dos novos insumos tecnológicos associados aos novos facoemulsificadores atravancariam as modernas máquinas e favoreceriam aquelas com materiais reutilizáveis.

O que ocorreu na verdade foi o contrário. Menos de cinco anos se passaram e o equipamento Universal II[®] foi retirado da linha de produção da empresa e substituído por outros que utilizam cassetes descartáveis. As modernas máquinas tiveram grande aceitação entre os oftalmologistas devido à grande segurança e eficiência que proporcionam na cirurgia.

Talvez na tentativa de diminuir os custos e com a possibilidade do uso de um aparelho de facoemulsificação eficiente, houve a utilização de apenas

um *kit* ou cassete de irrigação e aspiração para a realização de várias cirurgias de catarata num mesmo dia sem um estudo prévio para determinar a segurança desse procedimento.

Além do custo, acreditamos que diversos fatores estão envolvidos: cirurgiões habilidosos que realizam uma cirurgia de catarata em poucos minutos, alta demanda de cirurgias, principalmente no sistema público de saúde, baixo valor pago pela cirurgia no SUS, alto custo dos cassetes, poucos hospitais possuem autoclaves rápidas, o que gera uma demora na esterilização das vias de irrigação e aspiração que são autoclaváveis.

Nesse contexto criamos um modelo experimental utilizando olhos de porcos artificialmente contaminados com o vírus *Piry* e olhos não contaminados.

No presente estudo foi utilizada a técnica de RT-PCR e RT-*nested*-PCR para determinar a contaminação pelo vírus *Piry* nos instrumentais utilizados na cirurgia de catarata pela técnica de facoemulsificação e também para determinar a transmissão de material genético viral de um olho de porco contaminado para outro não contaminado.

Nós escolhemos o *Vesiculovirus Piry* porque é um vírus facilmente cultivado em laboratório, possui replicação rápida, fácil e produtora de alto número de cópias.

O vírus *Piry* pertence ao gênero *Vesiculovirus* da família *Rhabdoviridae*. A família *Rhabdoviridae* abriga vírus que infectam uma grande variedade de espécies, incluindo artrópodes, plantas e vertebrados. Os vesiculovírus (VSV) são os responsáveis pela estomatite vesicular (VS), enfermidade caracterizada pelo desenvolvimento de lesões vesiculares na boca, língua, no palato e na banda coronária dos cascos de bovinos, equinos e suínos, e faz diagnóstico diferencial com a febre aftosa (RODRIGUES et al., 2007).

Técnicas de biologia molecular como a RT-PCR e a RT-*nested*-PCR permitem a identificação de material genético através da produção de muitas cópias do ácido nucléico viral, mesmo quando a amostra contém baixos níveis virais ou apenas partículas defectivas.

A PCR foi inicialmente descrita por Kary Mullis, sendo uma técnica revolucionária que explora fatores de replicação do DNA como molde para síntese de uma nova fita complementar (MULLIS; FALOONA, 1987). Para a detecção do genoma de vírus de RNA, utiliza-se a transcrição reversa do RNA viral a DNA complementar. Com a PCR amplifica-se, *in vitro*, determinada região de um DNA. A *nested*-PCR é uma variante da técnica de PCR que tem por objetivo, em geral, aumentar a especificidade e a sensibilidade do método. Consiste de uma primeira PCR onde são utilizados os chamados *primers* externos, seguida de uma segunda PCR processando alíquota da primeira reação e utilizando *primers* internos, que reconhecem sequências internas aos *amplicons* da primeira reação, produzindo um segundo *amplicon*.

Em nosso estudo, por meio da técnica de RT-PCR, não foi possível obter amplificação de RNA viral com a presença de *amplicons* com ~290 pb, conforme demonstrado por Bonutti e Figueiredo (2005). Os resultados obtidos por essa técnica foram inconclusivos e não puderam ser analisados. Diversos fatores podem contribuir para esse resultado, como padronização dos reagentes, quantidade de vírus e/ou partículas virais presentes nas amostras, processamento das amostras contidas em solução fisiológica (SF 0,9%) e não em soro (produto da centrifugação do sangue). Em contrapartida, nas reações de RT-*nested*-PCR encontramos em todos os níveis pesquisados *amplicons* de ~130 pb, conforme demonstrado pelos mesmos autores. Esses *amplicons* determinam a presença de RNA viral nos locais encontrados. Dessa maneira, podemos observar que todos os componentes do facoemulsificador (ponteira, vias de irrigação e de aspiração, saco coletor) e os instrumentais ligados à cirurgia de facoemulsificação, como bisturi e luva, tornaram-se infectados após uma ou mais cirurgias.

Os dois primeiros olhos (C1 e N1) foram feitos como controle negativo e não encontramos resultado positivo em nenhuma de suas amostras, conforme esperávamos. Nas amostras da câmara anterior, antes da cirurgia dos olhos contaminados (C2, C3, C4, C5), todas apresentaram resultados positivos e nas amostras dos olhos não-contaminados (N2, N3, N4, N5), nenhuma apresentou

resultado positivo, mostrando que a contaminação foi eficiente e que não houve resultados falso-positivos.

A detecção de *amplicons* no saco coletor após a cirurgia de dois olhos não contaminados (amostras dos olhos N3 e N5) e em duas amostras da ponteira de olhos não contaminados (amostras dos olhos N3 e N5) corrobora com a possibilidade de que partículas virais ficaram em algum local do facoemulsificador, podendo ser nas vias internas de irrigação e aspiração da caneta, ou mesmo, nas vias de irrigação e aspiração.

Dentre as amostras da via de irrigação, em uma delas (N2) encontramos resultado positivo e como a via de irrigação traz o fluxo de líquido para dentro do olho, este resultado só pode ser positivo se houver refluxo de líquido durante o procedimento ou se houve contaminação na manipulação do equipamento.

A via de aspiração e o saco coletor era o local em que esperávamos encontrar maior índice de positividade entre as amostras dos olhos contaminados. Nestes, três amostras foram positivas no saco coletor e duas na via de aspiração. Nas amostras das luvas, obtivemos duas positivas dos olhos contaminados (C3 e C4) e duas positivas dos olhos não contaminados (N2 e N3), com isso podemos pensar que, manipulando-se a caneta contaminada com outra luva estéril, houve a transferência de material genético viral para essa luva, o que já era esperado.

Sabemos que muitos cirurgiões utilizam o mesmo cassete de irrigação e aspiração para várias cirurgias num mesmo dia trocando-se a caneta, sabemos ainda que outros trocam apenas a ponteira, mantendo o cassete e a caneta. Nossa intenção era de trocar todo o material entre as cirurgias e manter apenas as vias de irrigação e aspiração, mimetizando o que acontece com o uso dos cassetes, porém devido a uma inviabilidade técnica, isso não foi possível. Dessa maneira, acreditamos que outros estudos sejam necessários para que a prática de utilização de um mesmo cassete para várias cirurgias possa ser realizada com segurança para os nossos pacientes.

6. CONCLUSÕES

- A metodologia de RT-PCR não se mostrou adequada para a identificação de *amplicons* do *Vesiculovirus Piry* neste modelo experimental.
- A metodologia de RT-Nested-PCR mostrou-se adequada para a identificação de *amplicons* do *Vesiculovirus Piry* neste modelo experimental, divergindo, assim, dos resultados encontrados na RT-PCR.
- Neste modelo experimental foi possível detectar a presença de material genético viral utilizando a técnica de RT-Nested-PCR em todos os níveis pesquisados, demonstrando que todos os componentes do facoemulsificador ficaram contaminados após a cirurgia de catarata em olhos contaminados com o vírus *Piry*.
- Foi detectada a presença de material genético viral, não só nos componentes do facoemulsificador, como também nas luvas e nas lâminas utilizadas na cirurgia.
- Em dois olhos não contaminados pôde-se detectar a presença de material genético viral após a cirurgia de catarata através da facoemulsificação, demonstrando que, em algum momento da cirurgia houve a transmissão de material genético do vírus *Piry* para esse olho não contaminado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDLEY, UP. The lens epithelium: Focus on the expression and function of the α -crystallin chaperones. **Int J Biochem Cell Biol.**; v. 40, nº 3, p. 317-323, 2008.

ARAÚJO FILHO, A.; SALOMÃO, S. R.; BEREZOVSKY, A.; CINOTO, R. W.; MORALES, P. H.; SANTOS, F. R.; BELFORT Jr, R. Prevalence of visual impairment, blindness, ocular disorders and cataract surgery outcomes in low-income elderly from a metropolitan region of São Paulo-Brazil. **Arq Bras Oftalmol.**; v. 71, nº 2, p. 246-253, 2008.

AREDS THE AGE-RELATED EYE DISEASE STUDY RESEARCH GROUP The Age-Related Eye Disease Study (AREDS) System for Classifying Cataracts From Photographs: Report no. 4. **Am J Ophthalmol.**, v. 131, nº 2, p. 167-1752001.

BANKO, A.; KELMAN, C. D. Inventores; Cavitron Corporation. Patente Americana nº 3589363. 25 de julho de 1967. (<http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsrchnum.htm&r=1&f=G&l=50&s1=3589363.PN.&OS=PN/3589363&RS=PN/3589363>).

BOCHOW, T. W.; WEST, S. K.; AZAR, A.; MUNOZ, B.; SOMMER, A.; TAYLOR, H. R. Ultraviolet light exposure and risk of posterior subcapsular cataracts. **Arch Ophthalmol.**, v. 107, nº 3, 369-372, 1989.

BOLLINGER, K. E.; LANGSTON, R. H. What can patients expect from cataract surgery? **Cleve Clin J Med.**, v. 75, nº 3, ps. 193-196, 199-200, 2008.

BONUTTI, D. W.; FIGUEIREDO, T. T. M. Diagnosis of Brazilian vesiculoviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**; v. 100 nº 2, p. 193-196, 2005.

CHRISTEN, W. G.; MANSON, J. E.; SEDDON, J. M.; GLYNN, R. J.; BURING, J. E.; ROSNER, B.; HENNEKENS, C. H. A prospective study of cigarette smoking and risk of cataract in men. **JAMA**; v. 268, nº 8, p. 989-993, 1992.

CHYLACK Jr, L. T.; LESKE, M. C.; SPERDUTO, R.; KHU, P.; McCARTHY, D. Lens Opacity Classification System. **Arch Ophthalmol**, v. 106, nº 3, p. 330-334, 1988.

CHYLACK Jr, L.T.; WOLFE, J. K.; SINGER, D. M. et al. Longitudinal Study of Cataract Study Group. The Lens Opacities Classification System III. **Arch Ophthalmol**, v. 111, p. 831-836, 1993.

CONGDON, NG. Prevention strategies for age related cataract: present limitations and future possibilities. **Br J Ophthalmol**, v. 85, nº 5, p. 516-520, 2001.

CONSELHO BRASILEIRO DE OFTAMOLOGIA (CBO). Campanhas Sociais. Disponível em: www.cbo.com.br/cbo/campanhas_sociais.htm. Acessado em 29/05/2009.

CRUICKSHANKS, K. J.; KLEIN, B. E.; KLEIN, R. Ultraviolet light exposure and lens opacities: the Beaver Dam Eye Study. **Am J Public Health**, v. 82, nº 12, p. 1658-1662, 1992.

DICKSON, R.; EASTWOOD, A.; GILL, P.; MELVILLE, A.; O'MEARA, S.; SHELDON, T. Management of cataract. **Qual Health Care**, v. 5, nº 3, p. 180-185, 1996.

DUKE-ELDER, S. **System of Ophthalmology. Diseases of the Lens and Vitreous; Glaucoma and Hypotony**. Henri Kimpton, London, 1969, v. XI, cap. III - Cataract, p. 42-44.

FARIA, M. R. "O aparelho de facoemulsificação." In: REZENDE, F. **Cirurgia da Catarata**. Rio de Janeiro. Cultura Médica, 2000. 2ª Ed, cap. 22, p.187-194.

FISHER, R. F. Elastic constants of the human lens capsule. **J Physiol.**, v. 201, nº 1, p. 1-19, 1969.

FISHKIND, W. J. "The Phaco Machine: how it acts and reacts." In: AGARWAL, S.; AGARWAL, A.; AGARWAL, A. **Phacoemulsification**, Ed. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. New Delhi. 2004, cap. 8, p. 87-98.

FOX, G. M.; CROUSE, C. A.; CHUANG, E. L.; PFLUGFELDER, S. C.; CLEARY, T. J.; NELSON, S. J.; ATHERTON, S. S. Detection of herpesvirus DNA in vitreous and aqueous specimens by the polymerase chain reaction. **Arch Ophthalmol.**, v. 109, nº 2, p. 266-271, 1991.

GARCIA-FERRER, F. J.; LAYCOCK, K. A.; BUERGER, D. G.; FLOWERS, B. E.; FOOS, R. Y.; PEPOSE, J. S. Screening corneas for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA by polymerase chain reaction. **Am J Ophthalmol.** v. 119, nº 1, p. 7-13, 1995.

HALL, N. F.; LEMPERT, P.; SHIER, R. P. et al. Grading nuclear cataract: reproducibility and validity of a new method. **Br J Ophthalmol**, v. 83, p. 1159-63, 1999.

HOFT, R.H.; PFLUGFELDER, S.C.; FORSTER, R.K.; ULLMAN, S.; POLACK, F.M.; SCHIFF, E.R. Clinical evidence for hepatitis B transmission resulting from corneal transplantation. **Cornea**; v. 16, nº2, p. 132-7, 1997.

HOUFF, S.A., BURTON, R.C., WILSON, R.W., HENSON, T.E., LONDON, W.T., BAER, G.M., ANDERSON, L.J., WINKLER, W.G., MADDEN, D.L., SEVER, J.L. Human-to-human transmission of rabies virus by corneal transplant. **N Engl J Med.**; v. 300, nº11, p. 603-4, 1979.

KAHN, H.A.; LIEBOWITZ, H.M.; GANLEY, J.P.; KINI M.M.; COLTON, T.; NICKERSON, R.S.; DAWBER, T.R. The Framingham Eye Study. II. Association of ophthalmic pathology with single variables previously measured in the Framingham Heart Study. **Am J Epidemiol.**; v. 106, nº1, p. 33-41, 1977.

KELMAN, C. D. History of Phacoemulsification. In: AGARWAL, S.; AGARWAL, A.; AGARWAL, A. **Phacoemulsification**, Ed. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. New Delhi. 2004, cap. 3, p. 48-56.

KLEIN, B. E.; KLEIN, R.; LINTON, K. L.; FRANKE, T. Cigarette smoking and lens opacities: the Beaver Dam Eye Study. **AmJ Prey Med**, v. 9, nº 1, p. 27-30, 1993.

LANG C.J., HECKMANN J.G., NEUNDÖRFER B. Creutzfeldt-Jakob disease via dural and corneal transplants. **J Neurol Sci.**; v. 160, nº 2, p. 128-39, 1998.

LEE, H. M.; NAOR, J.; ALHINDI, R.; CHINFOOK, T.; KRAJDEN, M.; MAZZULLI, T.; ROOTMAN, D. S. Detection of hepatitis C virus in the corneas of seropositive donors. **Cornea**, v. 20, nº 1, p. 37-40, 2001.

LIMBURG, H.; BARRIA von-BISCHHOFFSHAUSEN, F.; GOMEZ, P.; SILVA, J. C.; FOSTER, A. Review of recent surveys on blindness and visual impairment in Latin America. **Br J Ophthalmol**, v. 92, nº 3, p. 315-319, 2008.

MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT” (MMWR), “Centers for Disease Control and Prevention”, Human Rabies Prevention. 07/05/2008. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr57e507a1.htm>. Acessado em 10/09/2009.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.**, v. 155, p. 335-350, 1987.

NOGUEIRA, M. L.; SIQUEIRA, R. C.; FREITAS, N.; AMORIM, J. B.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C.; ORÉFICE, F.; KROON, E. G. Detection of herpesvirus DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in vitreous samples from patients with necrotising retinitis. **J Clin Pathol.**, v. 54, nº 2, p. 103-106, 2001.

OLSON, L. Anatomy and Embryology of the Lens. In: Duane T. **Clinical Ophthalmology**, Ed. Hagerstown, Harper & Row, Publishers Inc., 1978, v. 1, cap 71, p. 1-8.

PEPOSE J.S., MACRAE S., QUINN T.C., WARD J.W. Serologic markers after the transplantation of corneas from donors infected with human immunodeficiency virus. **Am J Ophthalmol.**; v. 103, nº6, p. 798-801, 1987.

PHELPS, C. D. Examination and Functional Evaluation of Crystalline Lens. In: DUANE T. **Clinical Ophthalmology**, Ed. Hagerstown, Harper & Row, Publishers Inc., 1978, cap 72, p. 1-23.

REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am. J. Hyg.**; v.27, p. 493-497, 1938.

RESNIKOFF, S.; PASCOLINI, D.; ETYA'ALE, D.; KOCUR, I.; PARARAJASEGARAM, R.; POKHAREL, G. P.; MARIOTTI, S. P. Global data on visual impairment in the year 2002. **Bull World Health Organ**, v. 82, nº 11, p. 844-851, 2004.

Resolução RE nº2605, de 11 de agosto de 2006. Publicada no Diário Oficial da União, seção 1, edição 155, p. 28, de 14 de agosto de 2006, disponível em: <http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?data=14/08/2006&jornal=1&pagina=28&totalArquivos=80>. Acessado em 06/08/2009.

RITTER, L. L.; KLEIN, B. E.; KLEIN, R.; MARES-PERLMAN, J. A. Alcohol use and lens opacities in the Beaver Dam Eye Study. **Arch Ophthalmol**, v. 111, nº 1, p. 113-117, 1993.

RODRIGUES, L. L.; ROEHE, P. M.; BATISTA, H.; KURATH, G. Rhabdoviridae. In: Flores, E. F. **Virologia Veterinária**. Ed. UFSM, Santa Maria, 2007. cap 27, p. 689-719.

SALOMÃO, S.R.; CINOTO, R.W.; BEREZOVSKY, A.; ARAÚJO-FILHO, A.; MITSUHIRO, M.R.K.H.; MENDIETA, L.; MORALES, P.H.A.; POKHAREL, G.P.; BELFORT JR, R.; ELLWEIN, L.B. Prevalence and Causes of Vision Impairment and Blindness in Older Adults in Brazil: The São Paulo Eye Study. **Ophthalm Epidemiol.**; v. 15, nº 3, p. 167-75, 2008.

SBCII - SOCIEDADE BRASILEIRA DE CATARATA E IMPLANTES INTRA-OCULARES. Notícias. Disponível em: <http://www.catarata-refrativa.com.br/new/sbcii/load.asp?contentID=94>. Acessado em 09/06/2009.

SEIBEL, B. S. "The fluidics and physics of phaco". In: AGARWAL, S.; AGARWAL, A.; AGARWAL, A. **Phacoemulsification**, Ed. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. New Delhi. 2004, cap. 9, p. 99-108.

SHIMAZAKI, J.; TSUBOTA, K.; SAWA, M.; KINOSHITA, S.; OHKURA, T.; HONDA, M. Detection of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus in donor eyes using polymerase chain reaction. **Br J Ophthalmol.**, v. 78, nº 11, p. 859-862, 1994.

SHIMAZAKI, J.; TSUBOTA, K.; FUKUSHIMA, Y.; HONDA, M. Detection of hepatitis C virus RNA in tears and aqueous humor. **Am J Ophthalmol.**, v. 118, nº 4, p. 524-525, 1994.

SCHWARZ, A.; HOFFMANN, F.; L'AGE-STEHR, J.; TEGZESS, A. M.; OFFERMANN, G. Human immunodeficiency virus transmission by organ donation. Outcome in cornea and kidney recipients. **Transplantation**, v. 44, nº 1, p. 21-24, 1987.

SHUI, Y.B.; HOLEKAMP, N.M.; KRAMER, B.C.; CROWLEY, J.R.; WILKINS, M.A.; CHU, F.; MALONE, P.E.; MANGERS, S.J.; HOU, J.H.; SIEGFRIED, C.J.; BEEBE, D.C. The gel state of the vitreous and ascorbate-dependent oxygen consumption. **Arch Ophthalmol.**; v. 127, nº 4, p. 475-82, 2009.

SPECTOR A. Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. **FASEB J.**; v. 9, nº12, p.1173-82, 1995.

SU, C. S.; BOWDEN, S.; FONG, L. P.; TAYLOR, H. R. Detection of hepatitis B virus DNA in tears by polymerase chain reaction. **Arch Ophthalmol.**, v. 112, nº 5, p. 621-5, 1994.

THOLOZAN, F. M. D.; QUINLAN, R. A. Lens cells: More than meets the eye. **Int J Biochem Cell Biol.**, 39, nº 10, p. 1754-1759, 2007.

VERBRAAK, F. D.; GALEMA, M.; van den HORN, G. H.; BRUINENBERG, M.; LUYENDIJK, L.; DANNER, S. A.; KIJLSTRA, A. Serological and polymerase chain reaction-based analysis of aqueous humour samples in patients with AIDS and necrotizing retinitis. **AIDS**, v. 10, nº 10, p. 1091-1099, 1996.

WEST, S.; MUNOZ, B.; EMMETT, E. A.; TAYLOR, H. R. Cigarette smoking and risk of nuclear cataracts. **Arch Ophthalmol**, v. 107, nº 8, p. 1166-1169, 1989.

WOLFF, E. The lens and zonules. In: **Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit**. 8nd Ed. London, Chapman & Hall; 1997, cap. 12, p. 411-442.

YAMAMOTO, N.; WAKABAYASHI, T.; MURAKAMI, K. Intraocular and plasma HIV-1 RNA in HIV-infected patients with CMV retinitis and HIV-infected controls. **Scand J Infect Dis.**, v.34, nº 10, p. 742-75, 2002.

YOW, L.; BASTI, S. Physical and mechanical principles of phacoemulsification and their clinical relevance. **Indian J Ophthalmol.**, v. 45, nº 4, p. 241-9, 1997.

8. ANEXO

ANEXO

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

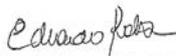


CERTIFICADO

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo entende que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 051/2008, sobre o projeto intitulado “*Estudo experimental sobre a contaminação por vírus no instrumental cirúrgico da facoemulsificação*”, sob a responsabilidade do **Doutor Roberto Pinto Coelho**, envolve tecido de animal abatido para consumo humano. Não cabe a esta Comissão avaliar as condições de bem estar dos animais utilizados para esse fim. Não obstante, os membros dessa Comissão não observam infração ética que possa aviltar a condução da pesquisa, considerando estes procedimentos aprovados, em reunião de *26 de maio de 2008*.

(We certify that the protocol nº 051/2008, about “*Experimental study of viral contamination in phacoemulsification instruments*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO - ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in *05/26/2008* meeting).

Ribeirão Preto, 26 de maio de 2008.


Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)