



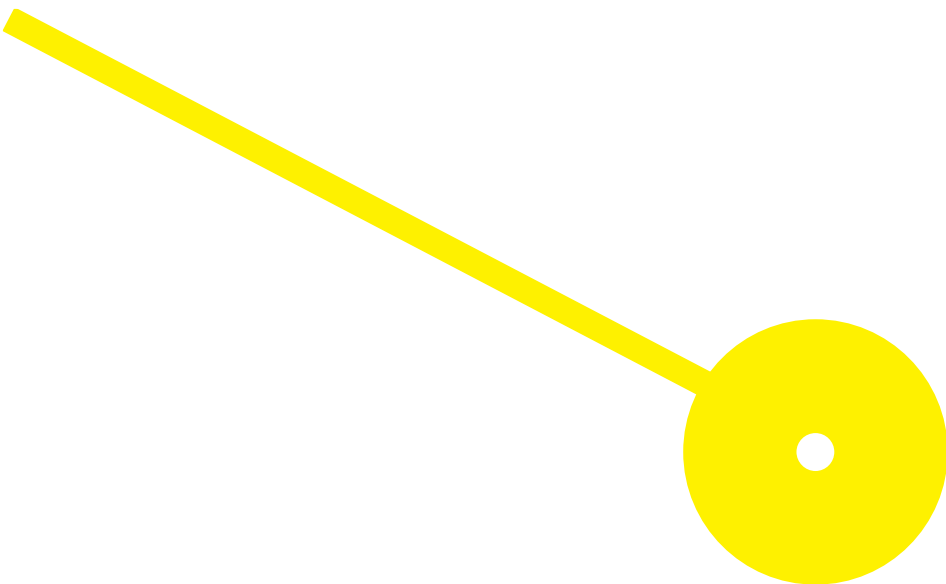
MESTRADO

Técnicas Laboratoriais em Biopatologia

Avaliação de artefactos de fixação do cristalino em olhos fetais

Carolina Chaves Teixeira

07/2023





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



SÃO JOÃO
H O S P I T A L

Avaliação de artefactos de fixação do cristalino em olhos fetais

Autor

Carolina Chaves Teixeira

Orientadores

Prof.^a Doutora Regina Augusta Alves Pereira da Silva, Escola Superior de Saúde do Porto
Mestre Ana Costa Braga, Centro Hospitalar Universitário de São João, EPE | Faculdade de Medicina
da Universidade do Porto

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Técnicas Laboratoriais em Biopatologia – Ramo de Histopatologia pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo.”

– Fernando Pessoa

Chegou o momento de agradecer a todos os que participaram de alguma forma no meu percurso académico, em especial no que se refere à realização deste relatório de estágio para conclusão do mestrado.

À minha orientadora Prof.^a Doutora Regina Silva, pela disponibilidade e ajuda nas dificuldades que surgiram neste projeto.

À minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Ana Costa Braga, por me ter “apresentado” a este mundo novo da Fetopatologia, pelos conhecimentos transmitidos e paciência durante a realização deste projeto.

À minha monitora de estágio Técnica Susana Silva, pela oportunidade de aprender (muito) sobre a área que tanto gosto, pela exigência e paciência ao longo dos meses de estágio. Foi um prazer absorver todo o conhecimento que tem para dar.

Aos meus pais, pois sem eles nunca teria chegado onde cheguei, nem onde vou chegar. Um simples “Obrigada” não é suficiente por tudo o que fizeram e fazem por mim e estou muito orgulhosa por ter grandes pessoas como exemplo a seguir. Mãe, obrigada por todas as vezes em que me ouviste a falar sobre órgãos e tentaste perceber o entusiasmo, assim como, pelas vezes em que me viste chorar e tentaste reconfortar-me mesmo com o mar a separar-nos.

À minha família, por ser o meu grande apoio na vida e no meu percurso académico.

Ao meu Tomás, por me ter ajudado com os gráficos deste projeto e, principalmente, por todas as vezes em que me mostrou que não devia duvidar das minhas capacidades, apesar de me ter ouvido a reclamar e com vontade de desistir. Obrigada por seres a minha claqué.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer às minhas estrelas que acredito que têm estado sempre a olhar por mim, especialmente na última fase.

Resumo

O estudo de autópsias fetais inclui a avaliação ocular, nomeadamente do cristalino. A constituição do cristalino condiciona à extensão dos efeitos de retração induzidos pela fixação e consequente formação de artefactos, que mimetizam as cataratas congénitas.

O objetivo deste projeto é avaliar o impacto de protocolos de fixação na indução de artefactos histológicos do cristalino em olhos provenientes de autópsias fetais.

Foram testadas duas soluções fixadoras (formaldeído a 4% e uma solução de formaldeído a 1% com glutaraldeído a 1,25%) e dois métodos de fixação (imersão convencional e imersão com incisões na esclerótica) nos 32 olhos de autópsias de interrupções médicas da gravidez.

A observação histológica do cristalino (coloração de hematoxilina-eosina) revelou glóbulos em 83,3% dos casos (40% na solução em estudo e 16% com incisão), vacúolos em 100% (47% na solução em estudo e 20% com incisão), fendas em 100% (47% na solução em estudo e 20% com incisão), material proteináceo em 10% (formaldeído a 4%) e ausência de fragmentação capsular em 13% dos casos com incisão.

A comparação dos quatro grupos não revelou diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros avaliados.

Esses resultados destacam a necessidade de realizar mais estudos para otimizar os protocolos de fixação de olhos fetais.

Palavras-chave: Cristalino; Fixação; Catarata; Olho; Fetopatologia

Abstract

The study of fetal autopsies includes ocular evaluation, namely the lens. The constitution of the lens conditions the extent of retraction effects induced by fixation and consequent formation of artefacts, which mimic congenital cataracts.

The aim of this project is to evaluate the impact of fixation protocols on the induction of histological lens artefacts in eyes from fetal autopsies.

Two fixative solutions (4% formaldehyde and a 1% formaldehyde solution with 1.25% glutaraldehyde) and two fixation methods (conventional immersion and immersion with incisions in the sclera) were tested in 32 eyes from autopsies of medical terminations of pregnancy.

Histological observation of the lens (hematoxylin–eosin staining) revealed globules in 83.3% of cases (40% in the study solution and 16% with incision), vacuoles in 100% (47% in the study solution and 20% with incision), clefts in 100% (47% in the study solution and 20% with incision), proteinaceous material in 10% (4% formaldehyde) and absence of capsular fragmentation in 13% of cases with incision.

The comparison of the four groups did not reveal statistically significant differences for the parameters evaluated.

The results highlight the need for further studies to optimize fetal eye fixation protocols.

Keywords: Lens; Fixation; Cataract; Eye; Perinatal Pathology

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Anatomia e histologia do olho.....	1
1.1.1.	Cristalino.....	3
1.2.	Organogénese do olho.....	3
1.3.	Patologias congénitas oculares mais frequentes.....	5
1.3.1.	Catarata congénita.....	5
1.4.	Procedimentos técnicos.....	6
1.4.1.	Técnicas de extração ocular.....	6
1.4.2.	Macroscopia do olho.....	7
1.4.3.	Técnica de incisão na esclerótica.....	8
1.5.	Processo de fixação.....	9
1.5.1.	Artefactos de fixação.....	10
1.6.	Objetivos.....	15
2.	Materiais e métodos.....	16
2.1.	Caraterização da amostra.....	16
2.2.	Procedimento e avaliação macroscópica.....	18
2.2.1.	Procedimento de extração ocular.....	18
2.2.2.	Descrição macroscópica.....	18
2.2.3.	Processo de fixação.....	18
2.3.	Etapas para obtenção de preparações histológicas.....	19
2.4.	Avaliação histológica.....	20
2.5.	Análise estatística.....	21
3.	Resultados.....	22
3.1.	Caraterização da amostra.....	22
3.2.	Avaliação macroscópica.....	22
3.3.	Avaliação histológica.....	23
3.3.1.	Glóbulos.....	24
3.3.2.	Vacúolos.....	26
3.3.3.	Fendas.....	29
3.3.1.	Separação capsular anterior/posterior.....	31

3.3.2.	Material proteináceo subcapsular.....	33
3.3.3.	Fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino.....	35
3.3.4.	Alteração da forma do cristalino.....	37
3.3.5.	Heterogeneidade da coloração do cristalino.....	39
4.	Discussão.....	42
5.	Conclusão.....	46
5.1.	Perspetivas futuras	47
	Referências Bibliográficas.....	48

Índice de Figuras

Figura 1 – Secção transversal do globo ocular, na qual se observam as diferentes estruturas que integram a sua composição, extraído de Netter et al. (5).....	1
Figura 2 – Imagem histológica da porção anterior do cristalino, na qual estão evidenciados o epitélio subcapsular, a cápsula e fibras do cristalino, extraído de Junqueira et al. (7).....	3
Figura 3 – Esquema da formação da vesícula do cristalino e do cálice ótico, extraído de Khurana et al. (4).....	4
Figura 4 – Esquema do desenvolvimento do cristalino, adaptado de Khurana et al. (4).....	4
Figura 5 – Imagens histológicas de catarata congénita em caso de autópsia fetal com Síndrome de Lowe.....	6
Figura 6 – Extração do globo ocular segundo uma abordagem anterior, adaptado de Verdijk et al. (2).....	7
Figura 7 – Extração do globo ocular segundo uma abordagem posterior, adaptado de Verdijk et al.(2).....	7
Figura 8 – Esquema representativo do procedimento macroscópico em peças de enucleação, extraído do Manual de Macroscopia do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar Universitário de São João.....	8
Figura 9 – Esquema da técnica de incisão na esclerótica adotada, descrita por Pang J et al. (28).9	9
Figura 10–Três representações de uma molécula monomérica de glutaraldeído, adaptado de Kiernan et al. (33).....	10
Figura 11– Reações químicas do formaldeído com a água com o próprio e com proteínas, adaptado de Nowacek et al. (37).....	10
Figura 12 – Artefactos comuns do cristalino em olhos fetais semelhantes às alterações identificadas em casos de catarata congénita, extraído de Herwig et al. (25).....	12
Figura 13 – Esquema representativo dos quatro grupos utilizados neste projeto: grupo 1 corresponde aos olhos fixados em formaldeído a 4% sem técnica de incisão na esclerótica; grupo 2 aos olhos fixados em formaldeído a 4% em associação com a técnica de incisão; grupo 3 aos olhos fixados na solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% sem técnica de incisão; grupo 4 aos olhos fixados na solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% em associação com a técnica de incisão.....	17
Figura 14 – Esquema representativo das etapas do procedimento do projeto, sendo estas a macroscopia (Etapa 1), técnica histológica (Etapa 2) e observação histológica (Etapa 3).	

Evidenciam-se os dois momentos de fixação, em que o primeiro (2h) é especialmente importante nos olhos esquerdos, pois permite o endurecimento da esclerótica antes de se efetuar a técnica de incisão.....	17
Figura 15 - Exame de transiluminação, em que se demonstra o cristalino translúcido, sem evidência de sombras.....	18
Figura 16 - Exemplo de técnica de incisão na esclerótica, na qual se observam as duas “janelas” para acesso às câmaras anterior e posterior, respetivamente.....	19
Figura 17 - Imagens histológicas de artefactos visualizados no cristalino dos globos oculares utilizados neste projeto. a) Imagem histológica do cristalino do olho direito do caso número 1 (feto com 24 semanas de idade gestacional), na qual se observa a presença de glóbulos (seta preta) e vacúolos (seta amarela). b) Imagem histológica do cristalino do olho direito do caso número 1 (feto com 24 semanas de idade gestacional), na qual se pode observar a alteração da forma, heterogeneidade da coloração e presença de fendas. c) Imagem histológica do cristalino do olho direito do caso número 14 (feto com 14 semanas de idade gestacional), na qual se pode observar separação capsular anterior/ posterior e fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino.....	41

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Critérios microscópicos e respetivas escalas utilizados na avaliação histológica do cristalino.....	20
Tabela 2 - Estatística descritiva e valores de p (Teste de Kruskal-Wallis) para todos os parâmetros histológicos analisados.....	23

Índice de Gráficos

Gráfico 1- Representação gráfica da distribuição dos valores obtidos nas medições oculares..	22
Gráfico 2 - Representação gráfica da distribuição de casos pelas diferentes categorias, relativamente à presença do parâmetro glóbulos, sendo SF - Formaldeído a 4% e SFG - Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	24
Gráfico 3 - Representação gráfica da distribuição do parâmetro glóbulos em cada um dos grupos, utilizando o cut-off de 5%, sendo SF - Formaldeído a 4% e SFG - Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	25

Gráfico 4 – Representação gráfica da distribuição do parâmetro vacúolos em cada um dos grupos, utilizando o cut-off de 25%, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	26
Gráfico 5 – Representação gráfica da distribuição de casos pelas diferentes categorias, relativamente à de presença do parâmetro vacúolos, SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	26
Gráfico 6 – Representação gráfica da distribuição do parâmetro vacúolos em cada um dos grupos, utilizando o cut-off de 5%, SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	28
Gráfico 7 – Representação gráfica da distribuição do parâmetro vacúolos em cada um dos grupos, utilizando o cut-off de 50%, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	28
Gráfico 8 – Representação gráfica da distribuição de casos pelas diferentes categorias, relativamente à presença do parâmetro fendas, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	29
Gráfico 9 – Representação gráfica da distribuição do parâmetro fendas em cada um dos grupos, utilizando o cut-off de 50%, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	30
Gráfico 10 – Representação gráfica da distribuição de casos pelas diferentes categorias, relativamente à presença do parâmetro separação capsular anterior/posterior, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	31
Gráfico 11 – Representação gráfica da distribuição do parâmetro separação capsular anterior/posterior em cada um dos grupos, utilizando o cut-off de 5%, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	32
Gráfico 12 – Representação gráfica da distribuição de casos pelas diferentes categorias, relativamente à presença do parâmetro material proteináceo subcapsular, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	33
Gráfico 13 – Representação gráfica da distribuição do parâmetro material proteináceo subcapsular em cada um dos grupos, utilizando o cut-off de 5%, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	34

Gráfico 14 – Representação gráfica da distribuição de casos pelas diferentes categorias, relativamente à presença do parâmetro fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	35
Gráfico 15 – Representação gráfica da distribuição do parâmetro fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino em cada um dos grupos, utilizando o cut-off de 5%, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	36
Gráfico 16 – Representação gráfica da distribuição de casos pelas diferentes categorias, relativamente à alteração da forma do cristalino, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	37
Gráfico 17 – Representação gráfica da distribuição do parâmetro alteração da forma do cristalino em cada um dos grupos, utilizando o cut-off de regular/irregular, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	38
Gráfico 18 – Representação gráfica da distribuição de casos pelas diferentes categorias, relativamente à heterogeneidade da coloração do cristalino, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	39
Gráfico 19 – Representação gráfica da distribuição do parâmetro heterogeneidade da coloração em cada um dos grupos, utilizando o cut-off de homogénea/heterogénea, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.....	40

1. Introdução

O estudo anatomopatológico em fetopatologia pressupõe a execução de autópsias fetais, as quais requerem a avaliação sistemática dos diferentes órgãos e sistemas, com o objetivo de identificar alterações do desenvolvimento e processos patológicos.

A avaliação ocular, nomeadamente do cristalino, integra esse estudo, e dedica-se à observação do crescimento, maturação ocular e de alterações patológicas subjacentes. A deteção de alterações oculares em autópsias fetais pode constituir um elemento chave da caracterização fenotípica, contribuindo para o diagnóstico final (1).

1.1. Anatomia e histologia do olho

A anatomia do olho é complexa e envolve diferentes estruturas que contribuem sinergicamente para a função a que se destinam, a visão (Figura 1) (2–5).

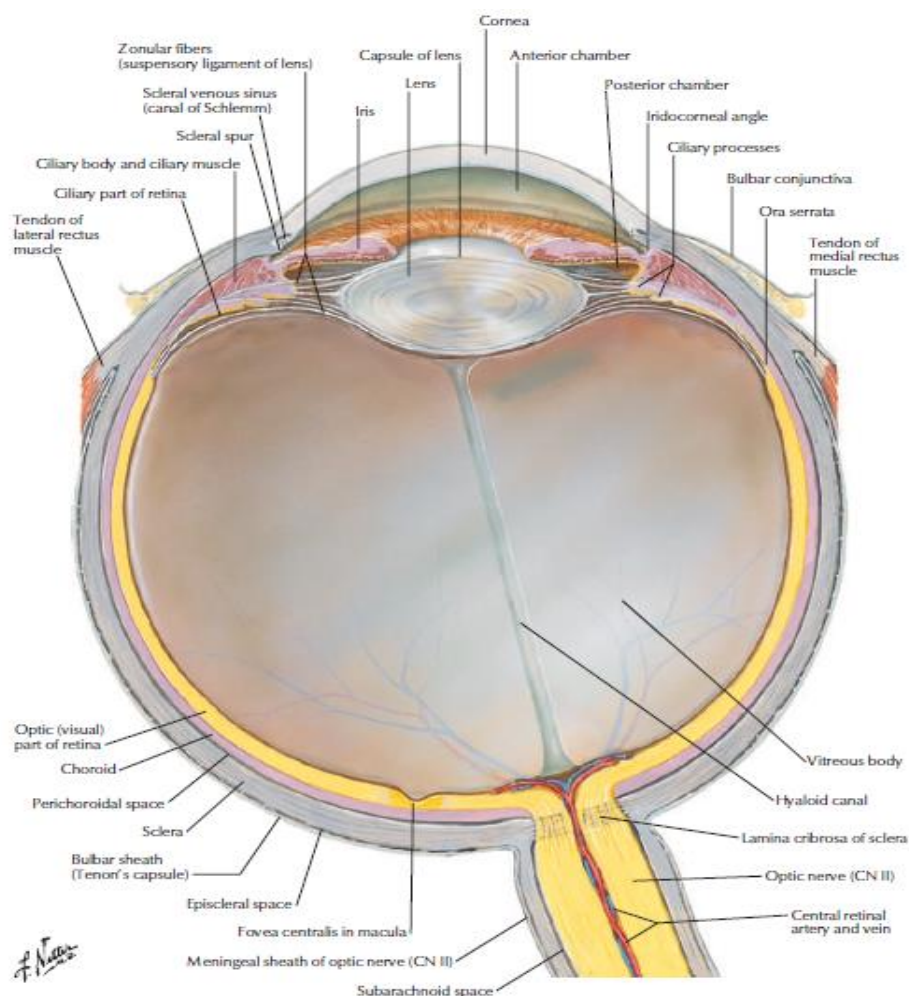


Figura 1 - Secção transversal do globo ocular, na qual se observam as diferentes estruturas que integram a sua composição, extraído de Netter et al. (5)

O globo ocular é a estrutura principal do olho e possui uma forma esférica. A sua composição compreende três camadas principais: camada externa (fibrosa) ou esclerótica, camada média (vascular) ou úvea e camada interna (nervosa) ou retina (4,6).

A esclerótica, de aparência branca, confere proteção e suporte estrutural ao olho. É constituída por tecido conjuntivo denso, onde feixes de fibras de colagénio se dispõem paralelamente (7).

A úvea subdivide-se em três partes, sendo estas a coroide, composta por tecido conjuntivo laxo e vasos sanguíneos que fornecem o suprimento sanguíneo do olho, corpo ciliar, que produz o humor aquoso e regula a forma do cristalino, e íris, responsável pela cor dos olhos e controlo da quantidade de luz que entra no olho através da regulação do tamanho da pupila. A pupila localiza-se no centro da íris e controla a quantidade de luz que entra no olho, ou seja, a pupila contrai-se em condições de luz intensa (miose) e dilata-se em condições de pouca luz (midríase) (8).

A retina é uma estrutura sensível à luz e contém células fotorrecetoras (bastonetes e cones) que convertem a luz em sinais elétricos que, posteriormente, são enviados ao cérebro através de um feixe de fibras nervosas, o nervo ótico, para formar a informação visual (9).

Para além destas estruturas principais, existem ainda outras estruturas importantes, tais como os músculos oculares, responsáveis pelos movimentos dos olhos, e as glândulas lacrimais, que produzem lágrimas para manter o olho lubrificado e protegido (10).

O interior do olho é constituído por três câmaras: anterior, posterior e vítrea. A câmara anterior é delimitada anteriormente pela córnea e posteriormente pela íris e superfície anterior do cristalino. A câmara posterior é posterior à íris e circundante ao equador do cristalino, separando-o do corpo ciliar. Estas duas câmaras, anterior e posterior, são contínuas entre si através da pupila e ambas contêm humor aquoso. O humor aquoso, produzido pelo corpo ciliar, alimenta as estruturas circundantes, nomeadamente a córnea e o cristalino. A câmara vítrea, a maior das três câmaras, encontra-se adjacente à camada interna da retina e é limitada anteriormente pelo cristalino. Esta câmara contém uma substância semelhante a um gel, denominado humor vítreo (3).

1.1.1. Cristalino

O cristalino é uma lente transparente, biconvexa e semissólida, localizada posteriormente à íris, que auxilia a focalização da luz na retina, ajustando a sua forma através da contração dos músculos ciliares (11,12).

A cápsula do cristalino é um revestimento acelular homogêneo, hialino e mais espesso na face anterior constituída, principalmente, por colagénio do tipo IV e glicoproteínas (7,10).

O epitélio subcapsular do cristalino é formado por uma única camada de células epiteliais cuboídes, na porção anterior, e é a partir deste epitélio que se originam as fibras constituintes da estrutura interna do cristalino (Figura 2) (7,13).

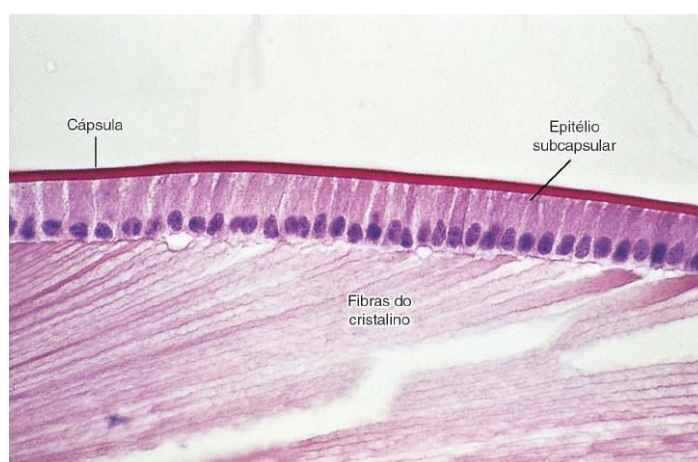


Figura 2 - Imagem histológica da porção anterior do cristalino, na qual estão evidenciados o epitélio subcapsular, a cápsula e fibras do cristalino, extraído de Junqueira et al. (7)

1.2. Organogênese do olho

O olho é constituído por tecidos com diferentes origens embrionárias, sendo o cristalino e a córnea originados a partir da ectoderme de superfície, enquanto a retina e as camadas epiteliais da íris e do corpo ciliar advêm da placa neural anterior. O desenvolvimento do olho é um processo dinâmico e organizado, que tem início na terceira semana de desenvolvimento e deverá estar finalizado na décima semana. (2,14).

No final da quarta semana de desenvolvimento, através da invaginação dos sulcos óticos, ocorre a formação das vesículas óticas, que podem ser descritas como divertículos da parede anterior do encéfalo e penetram no mesênquima adjacente. Estas vesículas entram em contacto com a ectoderme de superfície, tornando-a mais espessa, formando o placódio do cristalino, que irá originar a vesícula do cristalino (15,16).

Aquando o desenvolvimento da vesícula do cristalino, as vesículas óticas invaginam-se e dão origem ao cálice ótico, que apresenta uma parede dupla, sendo que, nesta fase, a vesícula do cristalino já se encontra dentro da cavidade do cálice ótico (Figura 3) (2,4,15,16). As células posteriores da vesícula do cristalino formam as fibras primárias do cristalino, orientadas ântero-posteriormente. As células anteriores originam um epitélio simples que recobre a superfície do cristalino e dão origem às fibras secundárias do mesmo, que constituem a maioria do cristalino maduro (Figura 4) (4,17).

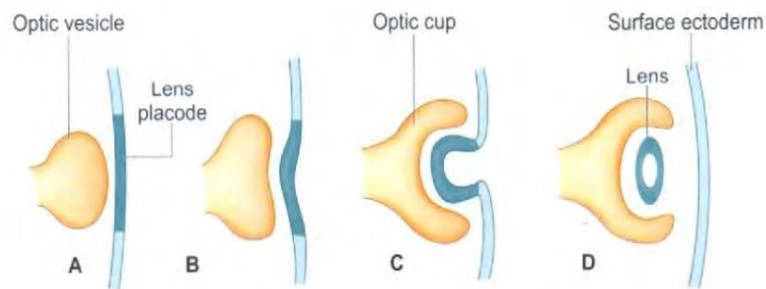


Figura 3 - Esquema da formação da vesícula do cristalino e do cálice ótico, extraído de Khurana et al. (4)

A - Espessamento da ectoderme de superfície que dá origem ao placóidio do cristalino. B e C - A vesícula ótica invagina, dando origem ao cálice ótico. A vesícula do cristalino já se encontra na cavidade do cálice ótico. D - Separação da vesícula do cristalino da ectoderme de superfície ao 33º dia de gestação.

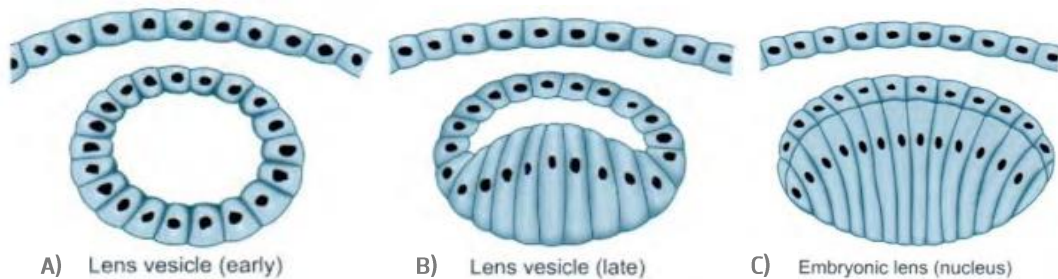


Figura 4 - Esquema do desenvolvimento do cristalino, adaptado de Khurana et al. (4)

A e B - As células da parede posterior da vesícula do cristalino alongam-se para formar as fibras primárias do cristalino, que obliteram a cavidade da vesícula do cristalino. C - As fibras primárias do cristalino, formadas até ao 3º mês de gestação, são preservadas como o núcleo compacto do cristalino, denominado como núcleo embrionário.

À medida que a vesícula ótica se forma é envolvida por uma bainha de mesênquima derivada de células da crista neural e da mesoderme. Esta bainha diferencia-se para formar as duas camadas do cálice ótico: a camada interna vascular (coroide) e a camada externa fibrosa (esclerótica) (18,19).

O mesênquima que recobre o cristalino em desenvolvimento divide-se em duas camadas para englobar um novo espaço denominado câmara anterior. A parede interna da câmara anterior que recobre o cristalino é uma estrutura vascular transitória, denominada membrana pupilar. As

camadas profundas desta parede sofrem vacuolização para criar uma outra cavidade, a câmara posterior, entre o cristalino e o restante da membrana pupilar (17).

O sangue é fornecido para o cristalino e retina em desenvolvimento através de um ramo terminal da artéria oftálmica, a artéria hialoide, que penetra na vesícula ótica através de um sulco, denominado este de fissura ótica. A porção da artéria que atravessa o corpo vítreo para alcançar o cristalino degenera durante o desenvolvimento fetal originando o cristalino maduro, enquanto a artéria central da retina é derivada da restante porção da artéria hialoide (13,17).

1.3. Patologias congénitas oculares mais frequentes

Os olhos fetais podem ser sede de anomalias do desenvolvimento e de outras patologias no período fetal e perinatal. Entre as patologias oculares descritas, destaca-se a catarata congénita, como sendo a principal causa de perda de visão em crianças. Outras patologias congénitas oculares mais frequentes são a retinopatia da prematuridade, o glaucoma congénito e infeções intrauterinas com afetação ocular (20,21,22).

São vários os fatores de risco que estão associados ao desenvolvimento de doenças oculares fetais, podendo estes serem desde fatores genéticos, como a exposição a agentes teratogénicos, idade materna avançada e patologia materna durante a gravidez, nomeadamente patologia infecciosa e a diabetes (20).

1.3.1. Catarata congénita

A catarata congénita afeta cerca de 1 em cada 10 000 nados vivos e, tal como referido previamente, é a principal causa de perda de visão em crianças. O diagnóstico clínico de catarata pressupõe a opacificação do cristalino, condicionando a alterações no índice de refração do mesmo. (22). A catarata congénita pode ser unilateral ou bilateral, isolada ou associada a outras condições, nomeadamente: síndromicas e genéticas, como a síndrome de *Lowe* e de *Patau*, doenças metabólicas (síndrome de *Leigh*), infeções intrauterinas (Rubéola) e ainda, raramente, traumáticas (23,24). Existe uma grande variedade de genes descritos associados a esta condição, incluindo padrões de hereditariedade autossómica dominantes, autossómica recessiva e autossómica recessiva ligada ao X (24). As cataratas congénitas hereditárias sem outras anomalias associadas têm melhor prognóstico em relação às cataratas com outras anomalias oculares e/ ou sistémicas coexistentes. As cataratas unilaterais são geralmente esporádicas e isoladas, sem evidência de história familiar de doença sistémica (23,24).

As cataratas congénitas traduzem-se em alterações histológicas específicas, caracterizadas pela alteração da configuração e organização do cristalino, hipereosinofilia das fibras, fendas extracelulares, vacuolização das fibras corticais superficiais e glóbulos eosinofílicos de tamanho variável (glóbulos de “*morgagnian-like*”), que condicionam à retenção dos núcleos das células epiteliais do cristalino no núcleo do cristalino e a alterações da cápsula (25). Está descrita a sobreposição dos artefactos induzidos por autólise, associados ao processo de fixação e a trauma mecânico durante a remoção do globo ocular com os achados histológicos identificados nas cataratas congénitas, mimetizando-os (Figura 5) (1,25).

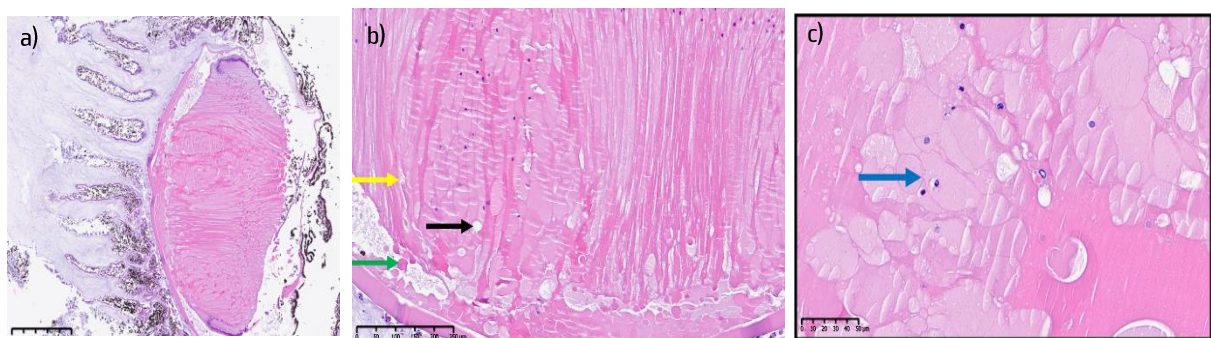


Figura 5 – Imagens histológicas de catarata congénita em caso de autópsia fetal com Síndrome de Lowe.

a) Alteração da configuração do cristalino com separação e fragmentação da cápsula. b) Vacuolização (seta a preto), fendas extracelulares (seta amarela) e glóbulos eosinofílicos de tamanhos variáveis (glóbulos “*morgagnian-like*”) (seta verde). c) Acumulação de células com morfologia semelhante às células do epitélio da bexiga (“*bladder cells*”) (seta azul).

1.4. Procedimentos técnicos

1.4.1. Técnicas de extração ocular

A extração ocular em autópsias fetais é efetuada classicamente segundo uma das duas abordagens técnicas: a abordagem anterior e a posterior (2,26). Na abordagem anterior, as pálpebras são afastadas através de um retrator e a conjuntiva é aberta junto ao limbo. A conjuntiva e a fáscia de *Tenon* subjacente são dissecadas da esclerótica com o auxílio de uma tesoura curva. Identificam-se os quatro músculos retos e posteriormente, procede-se à remoção dos mesmos. Antes de seccionar o nervo ótico, cortam-se os músculos oblíquos e o tecido adjacente. Após este último passo, o olho é totalmente extraído. No caso de não se conseguir observar o nervo ótico, opta-se por uma abordagem pela via nasal e a utilização de tesouras maiores e mais curvas (Figura 6) (2). A abordagem posterior inicia-se pela remoção do teto ósseo, expondo o conteúdo orbitário, seguindo-se a disseção dos tecidos. Com um bisturi, são seccionadas as estruturas inferiores, os músculos extraoculares, vasos, nervos e o anel de tecido conjuntivo que envolve o nervo ótico, assegurando-se a manutenção de um segmento de nervo

ótico adjacente ao globo ocular a ser extraído. De seguida, é realizada a disseção da fáschia de *Tenon*. Por fim, retiraram-se os restantes anexos periosteais e pressiona-se suavemente a superfície anterior do olho, de forma a destacá-la para o interior da cavidade craniana (Figura 7) (26).

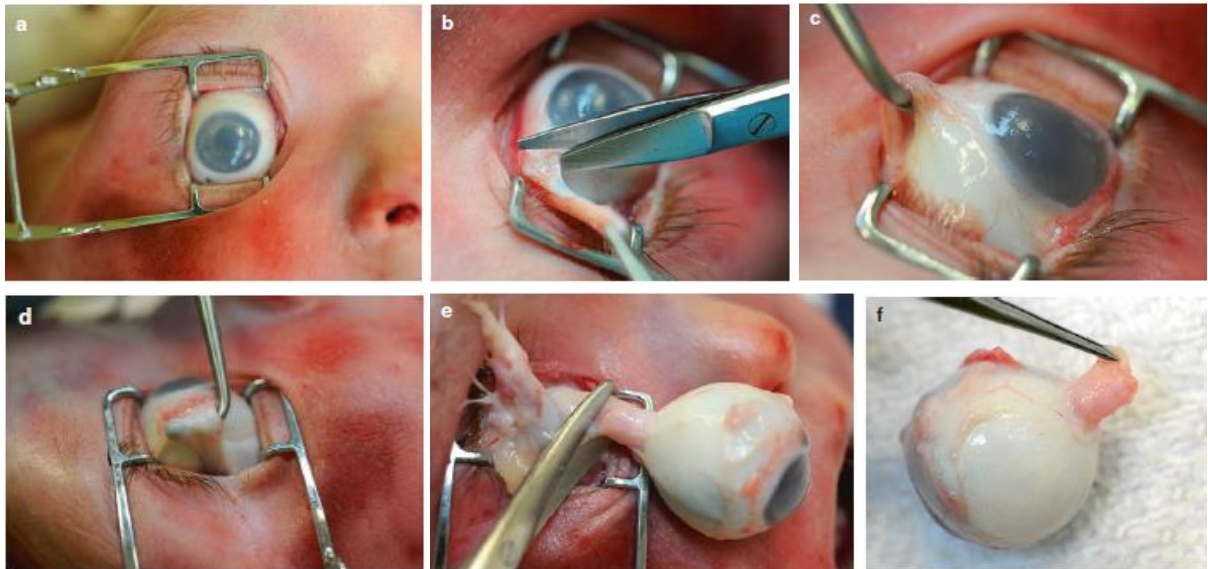


Figura 6 – Extração do globo ocular segundo uma abordagem anterior, adaptado de Verdijk et al. (2)
a) Vista anterior do globo ocular fetal antes da remoção, com o retrator para afastar as pálpebras, já inserido. b) Dissecção da conjuntiva junto ao limbo da córnea. c) Identificam-se os músculos retos e seccionam-se os mesmos. d) É utilizado um gancho para facilitar na identificação dos músculos. e) Secção do nervo ótico após remoção dos músculos retos e oblíquos e tecido adjacente. f) Globo ocular após extração com porção de nervo ótico.

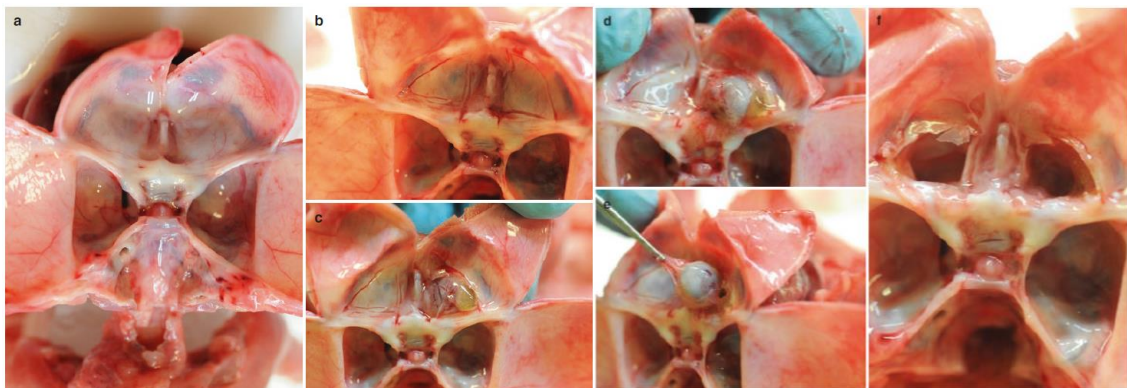


Figura 7 – Extração do globo ocular segundo uma abordagem posterior, adaptado de Verdijk et al. (2)
a) Vista do teto orbital após remoção do cérebro. b) É efetuado um corte vertical no teto orbital oposto à placa cribriforme do etmoide. Segundo corte feito medialmente, ao longo da asa do esfenóide, de encontro ao primeiro corte e a um terceiro feito ao longo do osso temporal. c) O teto orbital é removido. d) É exercida uma ligeira pressão nas pálpebras para expor o olho. e) Corte dos músculos extraoculares com o auxílio de pinças e tesouras. f) Orbitas vazias após remoção dos olhos.

1.4.2. Macroscopia do olho

Após a extração ocular decorre o procedimento de avaliação macroscópica do olho. A abordagem macroscópica dos olhos fetais é globalmente semelhante ao procedimento adotado em olhos de adultos sendo, contudo, mais minucioso, tendo em conta as menores dimensões dos mesmos. Os manuais de macroscopia descrevem procedimentos na generalidade semelhantes

entre si, não existindo variações do procedimento adotado para as peças operatórias de enucleação comparativamente ao procedimento adotado para os olhos obtidos de autópsias fetais/ de adulto (27).

Classicamente os procedimentos utilizados descrevem que a peça de enucleação deverá ser fixada intacta em formaldeído a 4% durante 24 horas e, posteriormente, colocada em etanol a 60% durante 12 a 24 horas, para endurecimento da esclerótica. De seguida, a peça é orientada, seguindo os pontos de referência: a córnea (anterior), o nervo ótico (posterior), os músculos e veias (posteriores e laterais). Ao efetuar a descrição macroscópica dever-se-á ter em atenção locais de traumatismo acidental ou cirúrgico. Alguns protocolos sugerem que a superfície externa seja pintada, com exceção da córnea, assim como a margem do nervo ótico (esta de outra cor) (27). O olho deverá ser seccionado (cortes sagitais ou transversais), adaptando-se os cortes à situação, de forma a representar mais adequadamente a lesão, devendo-se evitar seccionar pelo centro da córnea, para reduzir a deslocação do cristalino (Figura 8) (Anexos I a III) (27).

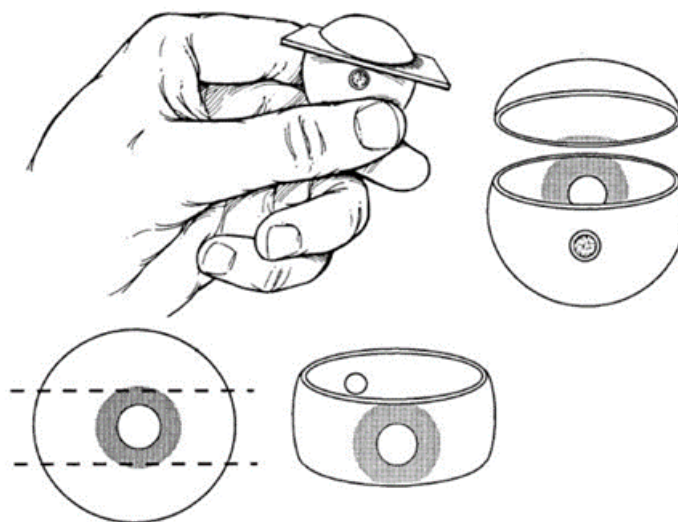


Figura 8 - Esquema representativo do procedimento macroscópico em peças de enucleação, extraído do Manual de Macroscopia do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar Universitário de São João

1.4.3. Técnica de incisão na esclerótica

Pang et al., num trabalho desenvolvido com recurso a olhos de ratinho, utilizaram uma técnica inovadora (“*Window Technique*”), na qual efetuaram duas incisões na esclerótica, uma na câmara anterior e outra na câmara posterior, de modo a permitir uma melhor penetração do fixador e diminuir a pressão intraocular nas câmaras. Inicialmente, os locais de excisão foram marcados com corante. Posteriormente, com uma agulha, a córnea foi perfurada em direção à câmara anterior e, de forma a expandir a incisão para uma pequena janela de, aproximadamente,

2-5mm, utilizaram uma tesoura. Esta técnica foi também utilizada para a acesso à câmara posterior (Figura 9) (28). Não existem registos na literatura da utilização desta técnica em olhos humanos, nomeadamente em olhos fetais.

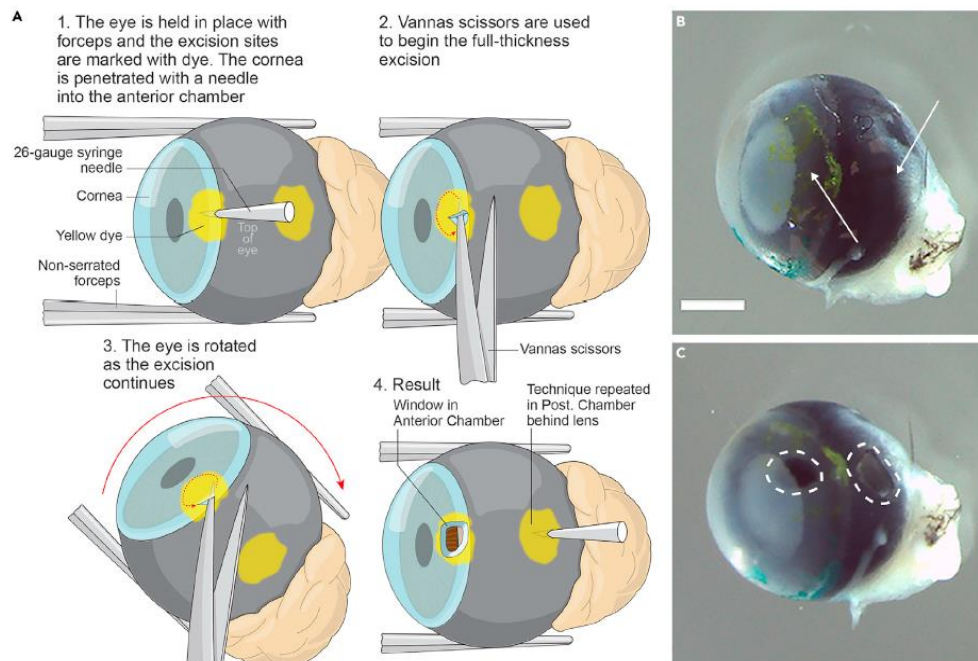


Figura 9 – Esquema da técnica de incisão na esclerótica adotada, descrita por Pang J et al. (28)
1 – Perfuração com uma agulha da córnea na câmara anterior. **2** – Expansão da perfuração com uma tesoura. **3** – Rotação do olho à medida que é feita a expansão da incisão. **4** – Obtém-se a “incisão em janela” e o mesmo procedimento é efetuado para acesso à câmara posterior.

1.5. Processo de fixação

Após a abordagem macroscópica segue-se o processo de fixação, que tem como objetivo preservar as estruturas morfológicas das células e tecidos, de forma a mantê-las o mais próximo possível do seu estado *in vivo*. O processo de fixação pretende ainda evitar a sua degradação e, assim, preparar os tecidos para as fases seguintes do processamento histológico (29,30).

Existem duas classes de fixadores: fixadores coagulantes ou não aditivos, que não se ligam às proteínas dos tecidos e precipitam-nas, e os fixadores não coagulantes ou aditivos, que se ligam às proteínas (31,32).

Os principais fixadores aditivos são os fixadores aldeídos, nomeadamente o formaldeído e o glutaraldeído. Estes fixadores formam ligações cruzadas entre as moléculas através da adição de grupos covalentes reativos (29,31,33). O glutaraldeído é um aldeído “bifuncional”, uma vez que possui dois grupos aldeído (-CHO) nas extremidades da sua cadeia carbónica, o que permite que participe em várias reações químicas, tanto com outros compostos que possuam grupos funcionais reativos (aminas) como também entre as próprias funções aldeído presentes

na molécula (Figura 10) (29,34). Apesar de promover uma melhor preservação ultraestrutural, o glutaraldeído é um fixador com taxa de difusão mais lenta (29,35,36).

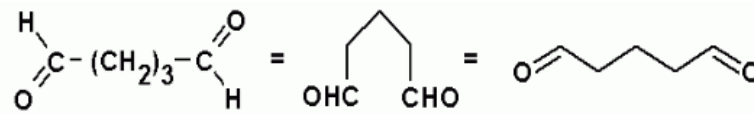


Figura 10-Três representações de uma molécula monomérica de glutaraldeído, adaptado de Kiernan et al. (33)

Quando o formaldeído é exposto à luz, isto é, ao oxigênio atmosférico e tecidual, ocorre a sua oxidação, formando ácido fórmico (Figura 11) (37). O ácido fórmico pode precipitar-se nos tecidos sob a forma de um pigmento castanho, sendo considerado um artefacto. Como tal, para evitar a formação deste precipitado, deve-se preparar o fixador em soluções tamponadas, ou, então, adicionar carbonato de cálcio para neutralizar a ação do pH da solução (31).

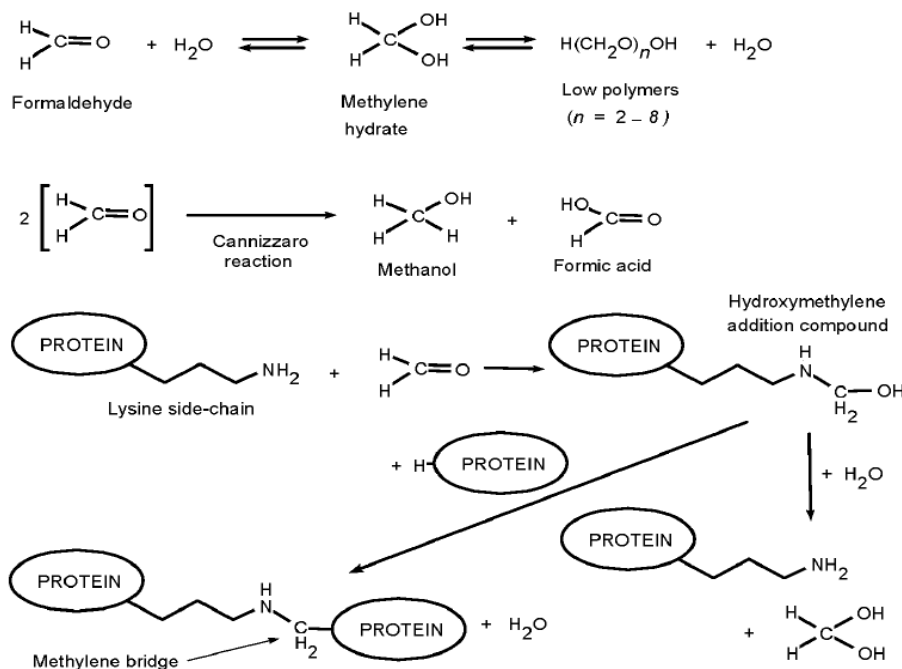


Figura 11 - Reações químicas do formaldeído com a água com o próprio e com proteínas, adaptado de Nowacek et al. (37)

1.5.1. Artefactos de fixação

Os artefactos associados a um processo de fixação ineficiente dificultam a observação histológica podendo levantar problemas de diagnóstico nos tecidos. No cristalino estão descritas alterações artefactuais que mimetizam os achados histológicos que caracterizam as cataratas. Entre os artefactos identificados encontram-se o aparecimento de glóbulos, vacúolos, fendas, a presença de material proteináceo subcapsular, a separação capsular anterior e posterior e a fragmentação da cápsula e do epitélio (1,2,25). Esses artefactos estão descritos como estando

associados a processos de fixação ineficazes, a autólise/ maceração e ainda secundários a trauma mecânico durante a remoção do globo ocular (1,25,38). A distinção entre os artefactos causados por autólise e maceração, dos provocados pelo processo de fixação, não é clara, ocorrendo sobreposição entre eles, considerando-se que os processos causais serão, pelo menos parcialmente, semelhantes.

É possível encontrar artefactos associados ao processo de autólise na generalidade dos globos oculares fetais, sendo estes mais extensos nos casos de abortamento espontâneo e morte fetal intrauterina, pelo tempo de retenção intrauterina após morte fetal mais prolongado (39,40). Nos casos das interrupções médicas da gravidez (IMG), o tempo que decorre entre a morte fetal e a expulsão é curto (habitualmente não excedendo as 24h), pelo que as alterações secundárias a autólise/ maceração, quando existem, são habitualmente inexistentes ou ligeiras (38-40).

Herwig et al. publicaram em 2011 um estudo que avaliou artefactos em globos oculares fetais, usando uma amostra de 341 olhos, provenientes de 180 fetos humanos, onde, 261 foram fixados em formol a 10% tamponado neutro e 80 na solução de *Karnovsky*, uma solução que combina paraformaldeído com glutaraldeído. O seu principal objetivo foi avaliar a frequência e extensão dos artefactos encontrados, com base na análise da origem dos fatores causais mais prováveis para estes fenómenos, e sugeriram que a origem dos artefactos fosse categorizada em efeitos mecânicos aquando da remoção do globo ocular, tipo de abortamento, fixação tardia com autólise associada e o tipo de fixador. *Herwig* et al. constataram que, na maioria dos casos, foram observados artefactos como extravasão de pigmento e alterações autolíticas da retina. Verificaram que quase todos os olhos apresentavam alterações do cristalino muito semelhantes às alterações encontradas em olhos de adultos diagnosticados com cataratas. Também observaram alterações oculares estruturais associadas a síndromes sistémicas que, na maioria dos casos, podiam ser distinguidas de artefactos. Os mesmos autores concluíram, neste estudo, que os artefactos encontrados no cristalino se sobrepõem frequentemente, dificultando a caracterização histológica (1). Devido ao facto de existirem artefactos que mimetizam as alterações do cristalino identificadas em casos de catarata congénita, *Herwig* et al. sugerem que o diagnóstico anatomopatológico de catarata congénita não deva ser baseada exclusivamente no exame histopatológico, propondo a conjugação com uma avaliação macroscópica detalhada, recorrendo à técnica de transiluminação, defendendo um diagnóstico integrado com os achados macroscópicos (1). Os mesmos autores, num estudo realizado em 2013, reuniram uma amostra

de 20 olhos, provenientes de 10 fetos, com idade gestacional compreendida entre as 15 e as 36 semanas, 5 dos quais resultaram de abortamentos espontâneos e os outros 5 de interrupções médicas da gravidez (IMG). Relativamente à fixação, um olho do par foi fixado em formol a 10% tamponado neutro e o outro na solução de *Karnovsky* (25). Neste estudo os autores caracterizaram os artefactos do cristalino dos olhos fetais e exploraram os diversos fatores que poderiam afetar a morfologia do mesmo, salientando a importância dos fixadores (25). Como resultados, todos os cristalinos examinados neste estudo apresentaram alterações morfológicas. Macroscopicamente, o cristalino dos olhos fixados na solução de *Karnovsky* apresentavam-se amarelados, enquanto os cristalinos fixados em formaldeído eram geralmente mais esbranquiçados. Embora os cristalinos fixados em glutaraldeído apresentassem uma quantidade inferior de alterações estruturais em relação aos cristalinos fixados em formaldeído, o tipo de achados identificados eram semelhantes e foram interpretados como artefactos. Estes artefactos estavam presentes numa extensão variável e compreendiam glóbulos, vacúolos, fendas, separação capsular anterior e posterior, material proteináceo capsular, fragmentação da cápsula ou do epitélio do cristalino e alteração da forma - umbilicação posterior do cristalino (Figura 12) (25).

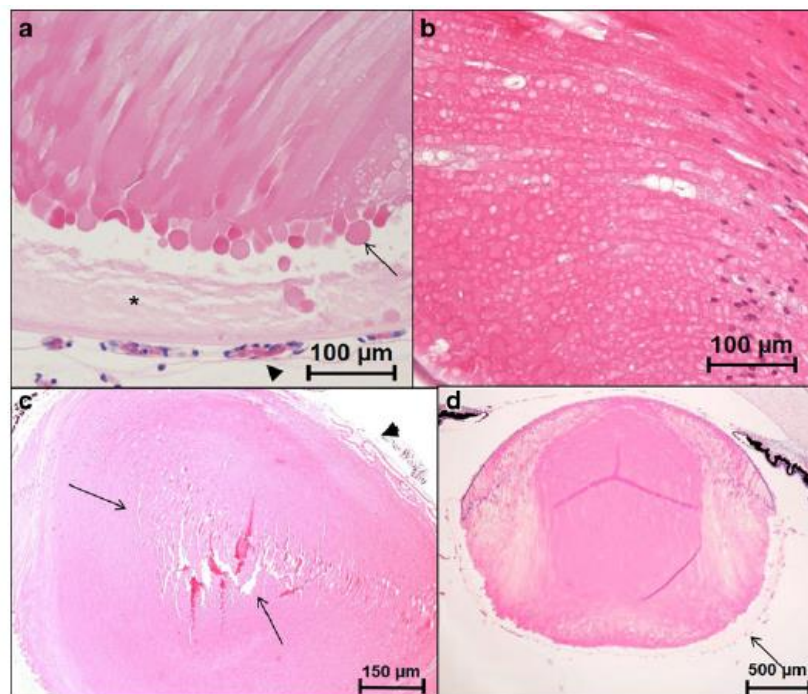


Figura 12 – Artefactos comuns do cristalino em olhos fetais semelhantes às alterações identificadas em casos de catarata congénita, extraído de Herwig et al. (25).
a) Glóbulos (seta) e material proteináceo subcapsular (asterisco). b) Vacúolos (seta). c) Fendas (seta) e fragmentação do epitélio (cabeça da seta). d) Separação capsular posterior (seta).

Os autores verificaram que os glóbulos, corpúsculos redondos e eosinofílicos, foram, maioritariamente, encontrados no polo posterior e eram semelhantes aos glóbulos identificados em casos de cataratas avançadas em adultos. Os vacúolos, identificados como alterações semelhantes a inclusões brilhantes, tinham uma forma redonda ou tubular, dependendo do corte. Constataram que as fendas se encontravam, normalmente, no centro do cristalino e representavam um artefacto de corte. A separação capsular foi facilmente identificada como um espaço vazio entre a cápsula e o córtex do cristalino encontrado no polo anterior e/ou posterior do mesmo. Deduziram que as ruturas na cápsula do cristalino, muitas vezes em combinação com um epitélio fragmentado, foram resultantes do processo de autólise e da etapa da microtomia. A umbilicação posterior, causada pela fixação e não presente *in vivo*, foi mais visível em fetos com mais de 20 semanas (25).

Numa análise mais detalhada dos 20 olhos, embora sem significado estatístico, Herwig et al. averiguaram que os glóbulos estavam presentes em maior frequência nos cristalinos fixados em formaldeído do que nos cristalinos fixados na solução de *Karnovsky*. Por outro lado, foi nos cristalinos fixados na solução que se verificou a ocorrência de separação capsular mais frequentemente. Contudo, os restantes artefactos não pareceram estar associados a um fixador em específico (25). Adicionalmente, os autores verificaram que o material proteináceo subcapsular estava presente ligeiramente em maior quantidade nos cristalinos de fetos de IMG. No entanto, foi encontrada uma maior quantidade de artefactos (fragmentação capsular e do epitélio do cristalino) nos olhos de fetos provenientes de abortamentos espontâneos, possivelmente devido à autólise/ maceração, pelo tempo prolongado de retenção intrauterina. Os artefactos (glóbulos, vacúolos, fendas e separação capsular) ocorreram independentemente do tipo de morte. Relativamente à idade gestacional, *Herwig et al.* não encontraram nenhuma associação ou tendência de associação da idade com o tipo ou extensão dos artefactos identificados no cristalino (25). Os autores concluíram que estes artefactos são frequentes e variáveis, constituindo um desafio diagnóstico (25).

Segundo *Cogan*, o cristalino “não é mais do que uma bolsa de proteínas, solutos e água” e devido à concentração elevada de proteínas, os processos de fixação, inclusão e corte estão condicionados. O cristalino está rodeado por uma cápsula rica em colagénio, na qual se fixa uma matriz extracelular de pequenas fibras elásticas, a zónula (9,10,41,42). A transparência do cristalino está associada à regularidade das suas fibras, ou seja, o facto da sua disposição ser altamente ordenada faz com que estas se tornem numa série de superfícies refrativas coaxiais

(43,44). Outro fator é a presença e distribuição uniforme das proteínas solúveis no citoplasma, cuja manutenção desta distribuição se deve ao citoesqueleto (22,44). As características tecidulares das estruturas oculares, nomeadamente do cristalino, condicionam a extensão dos efeitos de retração induzidos pela fixação. No sentido de otimizar a fixação dos tecidos para, desta forma, reduzir os artefactos associados a este processo, é necessário combinar as propriedades físicas e químicas dos fixadores com as do tecido a analisar. Consequentemente, é necessário desenvolver e testar protocolos de fixação adaptados (2,41).

Num estudo efetuado em 1994, *Margo et al.* pretendiam encontrar o fixador ideal para todas as estruturas do globo ocular, de forma a que este causasse menor redução do volume interno das câmaras anterior e vítrea e permitisse uma melhor preservação dos tecidos intra-oculares mais sensíveis. Para tal, na primeira parte do estudo, utilizaram soluções de formaldeído a 4%, 2% e 1% em olhos de cães; coelhos e porcos. Um olho de cada par foi fixado por imersão em formaldeído a 4% como controlo, e o outro olho em formaldeído a 2% ou 1%, durante 36h. Na segunda parte do estudo, foram testadas diferentes misturas de formaldeído com glutaraldeído, de forma a determinar a sua concentração e osmolaridade ótimas para a preservação celular (45). A osmolaridade está associada à quantidade de sais de fosfato adicionados para tamponar as soluções fixadoras, de forma a serem armazenadas durante mais tempo sem perder as suas propriedades (45,46). Foi escolhido, como solvente do formaldeído, o glutaraldeído, visto que apresenta baixa osmolaridade e maior disponibilidade nos laboratórios (45). Os autores verificaram que, na primeira parte do estudo, o volume após fixação das câmaras anterior e vítrea foi inversamente proporcional à concentração do formaldeído utilizado, ou seja, a retração do volume dos olhos fixados em formaldeído tamponado a 4% é causada pela sua elevada osmolaridade. Na segunda parte do estudo, a mistura de fixadores de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% demonstrou ótimos resultados na fixação de todo o globo ocular, dado que reduziu a distorção do tecido sem comprometer a preservação celular. Com esta mistura de fixadores, a retina neurosensorial era menos propensa de se destacar do epitélio do pigmentar da retina e a câmara anterior manteve uma forma mais próxima ao estado *in vivo* (45).

1.6. Objetivos

O objetivo do presente estudo é avaliar o impacto de diferentes protocolos de fixação na indução de artefactos histológicos do cristalino em olhos fetais. Desta forma pretende-se contribuir para a otimização deste processo em globos oculares fetais, com a redução dos artefactos induzidos pela fixação, assegurando uma adequada interpretação histológica dos achados observados no cristalino, com vista ao adequado diagnóstico anatomopatológico.

2. Materiais e métodos

A componente experimental desenvolvida tem por base um estudo caso controlo, prospetivo e observacional, no qual serão testados novos protocolos de fixação de olhos fetais. Este foi desenvolvido na Unidade de Fetopatologia do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar Universitário de São João (CHUSJ) e aceite pela Comissão de Ética desta instituição (Nº263/22) (Anexo IV).

Como ponto de partida à realização deste projeto foi realizada uma revisão da literatura para aprofundamento do tema e perceção da sua importância. Decorreram várias reuniões com a equipa de trabalho nas diferentes fases de desenvolvimento do projeto (Prof.^a Dr.^a Ana Costa Braga, médica especialista em Anatomia Patológica, e Técnica Susana Silva, Técnica de Anatomia Patológica).

2.1. Caracterização da amostra

Durante o período de estágio no Centro Hospitalar e Universitário de São João foi efetuada a colheita, fixação e exame histopatológico dos olhos fetais utilizados neste projeto. Os globos oculares utilizados foram provenientes de fetos de IMG de todas as idades gestacionais rececionados na Unidade de Patologia do Desenvolvimento do serviço de Anatomia Patológica no período do estágio curricular. A seleção de casos de IMG, excluindo os casos de abortamento espontâneo e de mortes fetais, pretendeu reduzir os artefactos induzidos pela autólise associada ao tempo de retenção intrauterino, aspetos estes que seriam confundidores para a avaliação dos artefactos induzidos pela fixação, tal como foi previamente descrito nos estudos desenvolvidos por Herwig et al. (1,25).

Neste projeto foram utilizados os olhos de 16 fetos, sendo que em metade dos casos a fixação ocular após extração foi realizada com formaldeído a 4% (SF) (n=8 fetos) e, na metade restante, a fixação após extração foi realizada com uma solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% (SFG) (n=8 fetos). Em todos os fetos, nos olhos esquerdos foi efetuado o procedimento adicional de técnica de incisão na esclerótica descrito por *Pang et al.*, descrito previamente, e que consiste na realização de duas “janelas” na esclerótica, e os olhos direitos foram fixados pela técnica padrão de imersão (28,47). Como tal, o grupo 1 corresponde aos olhos fixados em formaldeído a 4% sem efetuar a técnica de incisão na esclerótica; o grupo 2 aos olhos fixados em formaldeído a 4% em associação com a técnica; o grupo 3 aos olhos fixados com a solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% sem efetuar a técnica e o grupo 4 aos olhos

fixados nesta solução em estudo em associação com a técnica de incisão na esclerótica (Figura 13).

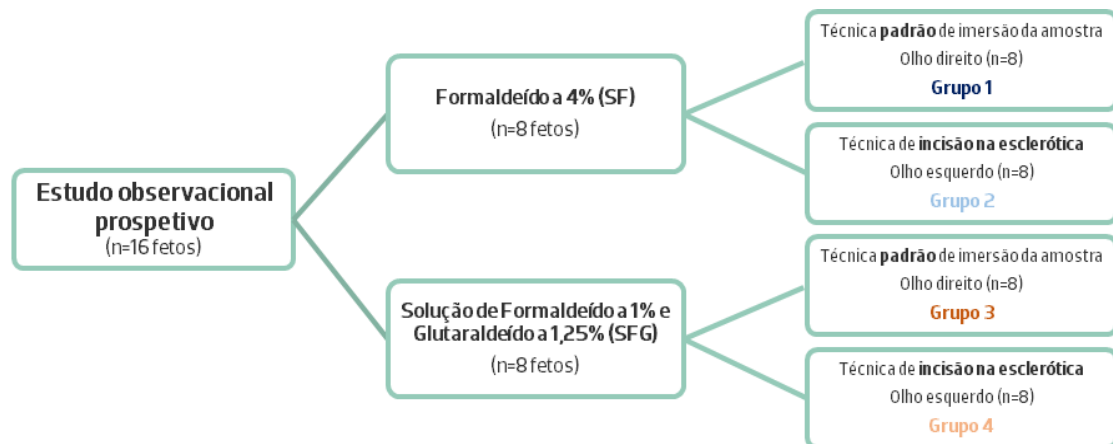


Figura 13 – Esquema representativo dos quatro grupos utilizados neste projeto: grupo 1 corresponde aos olhos fixados em formaldeído a 4% sem técnica de incisão na esclerótica; grupo 2 aos olhos fixados em formaldeído a 4% em associação com a técnica de incisão; grupo 3 aos olhos fixados na solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% sem técnica de incisão; grupo 4 aos olhos fixados na solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% em associação com a técnica de incisão.

Os fetos provenientes de IMG estudados neste projeto foram rececionados no serviço de Anatomia Patológica já acondicionados em formol a 10% tamponado neutro. Estes fetos após expulsão foram colocados automaticamente num recipiente com formol no bloco de partos, segundo as orientações do Serviço de Obstetrícia e posteriormente enviados para o Serviço de Anatomia Patológica. A realização da autópsia fetal (com extração dos olhos fetais) foi realizada posteriormente, 12h-72h após receção no Serviço de Anatomia Patológica.

O procedimento deste projeto está dividido em três grandes etapas: macroscopia, técnica histológica e avaliação histológica, representadas na Figura 14.

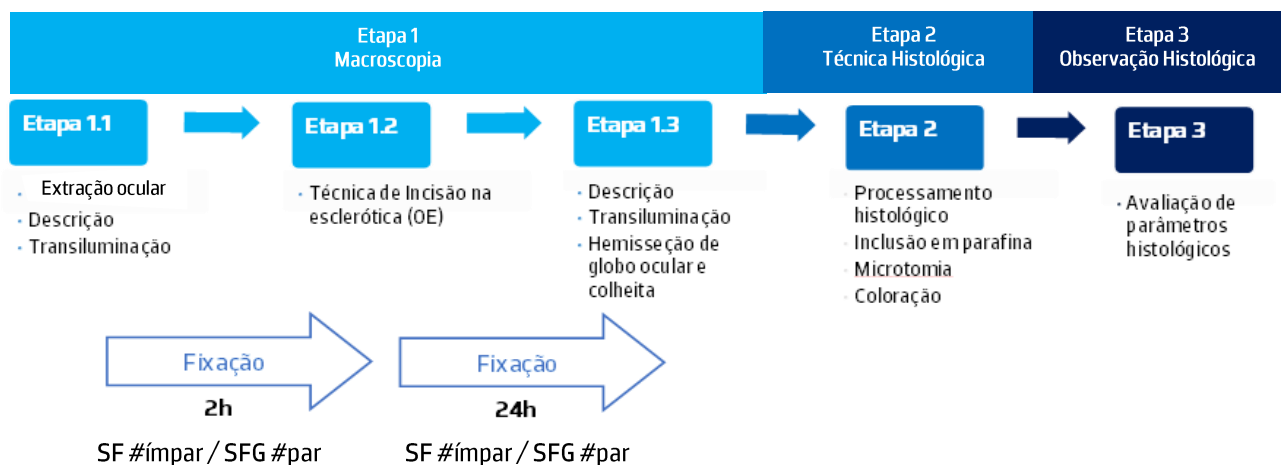


Figura 14 – Esquema representativo das etapas do procedimento do projeto, sendo estas a macroscopia (Etapa 1), técnica histológica (Etapa 2) e observação histológica (Etapa 3). Evidenciam-se os dois momentos de fixação, em que o primeiro (2h) é especialmente importante nos olhos esquerdos, pois permite o endurecimento da esclerótica antes de se efetuar a técnica de incisão.
SF – Formaldeído a 4%; SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

2.2. Procedimento e avaliação macroscópica

2.2.1. Procedimento de extração ocular

A extração dos olhos foi realizada no momento da autópsia seguindo uma abordagem posterior, com a remoção do teto ósseo, expondo o conteúdo orbitário, seguindo-se a disseção dos tecidos. Com um bisturi, foram seccionadas as estruturas inferiores, os músculos extraoculares, vasos, nervos e o anel de tecido conjuntivo que envolve o nervo ótico, assegurando-se a manutenção de um segmento de nervo ótico adjacente ao globo ocular a ser extraído. De seguida, foi realizada a disseção da fáscia de *Tenon*. Por fim, retiraram-se os restantes anexos periosteais, pressionando-se suavemente a superfície anterior do olho, de forma a destacá-lo para o interior da cavidade craniana (26). Este procedimento foi realizado cuidadosamente, de forma a evitar qualquer compromisso das diferentes estruturas oculares, nomeadamente do cristalino.

2.2.2. Descrição macroscópica

Antes da aplicação do protocolo de fixação, foi efetuada uma avaliação macroscópica que compreendeu a medição das dimensões ântero-posterior, horizontal (latero-medial) e vertical (supero-inferior) do olho; comprimento do nervo ótico; dimensões da córnea (diâmetros horizontal e vertical) e descrição do segmento anterior (córnea e íris), presença/ausência do cristalino e achados do exame de transiluminação (Figura 15) (Anexos V e VI) (27).

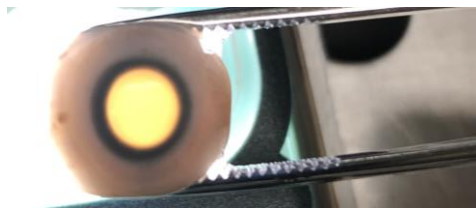


Figura 15 - Exame de transiluminação, em que se demonstra o cristalino translúcido, sem evidência de sombras.

2.2.3. Processo de fixação

Após a avaliação macroscópica estar concluída, os olhos esquerdos foram colocados nos respetivos fixadores (Formaldeído a 4% ou solução de Formaldeído a 1% e Glutaraldeído a 1,25%), durante 2h, para endurecimento da esclerótica, de forma a facilitar a disseção da mesma. Posteriormente, adotou-se a técnica de “janela” (técnica de incisão na esclerótica) de *Pang J et al*

(Figura 16), descrita previamente (28). No final, os olhos foram colocados nos respectivos fixadores durante 24h, na proporção olho/fixador 1:20 (28,47).

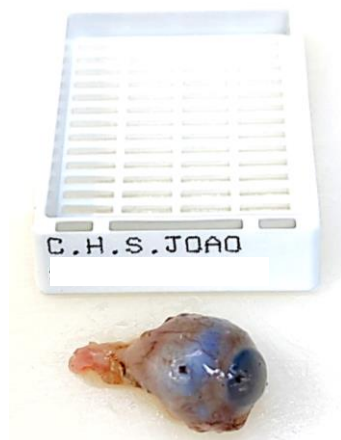


Figura 16 - Exemplo de técnica de incisão na esclerótica, na qual se observam as duas "janelas" para acesso às câmaras anterior e posterior, respetivamente.

Os olhos direitos seguiram a técnica padrão de fixação nos fixadores respetivos, durante 24h, também na proporção olho/fixador 1:20.

Após a aplicação do protocolo de fixação, foi realizada, novamente, a avaliação macroscópica e de transiluminação. Seguiu-se a hemissecção dos globos oculares segundo o eixo ântero-posterior, poupando a localização central da pupila, de forma a não danificar o cristalino. Foi posteriormente observada e descrita a superfície de corte e realizada colheita de fragmentos para cassetes.

2.3. Etapas para obtenção de preparações histológicas

Os fragmentos obtidos seguiram o fluxo da rotina do laboratório de Anatomia Patológica do CHUSJ, com processamento histológico de 12h (Anexo VII), inclusão em parafina, microtomia com uma espessura de 3 μ m e coloração de rotina de Hematoxilina-Eosina (HE) (Anexo VIII).

O processamento histológico teve como objetivo impregnar o tecido num meio sólido, firme o suficiente para permitir cortes finos e suave o suficiente para não danificar nem a faca nem o tecido. Este processamento dividiu-se em três etapas: desidratação; diafanização e impregnação (31). Na etapa da desidratação a água e o fixador foram removidos e substituídos por um agente desidratante, através da utilização de concentrações crescentes de etanol, uma vez que a impregnação foi efetuada num meio não aquoso (parafina) (30). Na diafanização ocorreu a remoção do agente desidratante, substituindo-o por um fluído miscível (xilol) por ele e

pelo meio de impregnação (48). Por fim, na impregnação decorreu a substituição do agente diafanizante pelo meio de impregnação, a parafina (29).

2.4. Avaliação histológica

Depois de recolhidos todos os dados fundamentais à realização do projeto, foi efetuada, por 3 observadores independentes, uma avaliação histológica cega e semiquantitativa do cristalino nas lâminas obtidas (Anexo IX).

Esta avaliação teve por base a presença dos parâmetros histológicos: glóbulos, vacúolos, fendas, separação capsular anterior/posterior, material proteináceo subcapsular, fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino. Para tal, foi utilizada uma escala percentual, com sete categorias: categoria 1 – 0%; categoria 2 – 1 a 5%; categoria 3 – 6 a 25%; categoria 4 – 26 a 50%; categoria 5 – 51 a 75%; categoria 6 – 76 a 99% e categoria 7 – 100%. Nos parâmetros glóbulos e vacúolos foi também avaliada a sua localização: centrais, periféricos e mista (centrais e periféricos). O parâmetro forma foi avaliado nas seguintes categorias: categoria 1 – regular; categoria 2 – ligeiramente irregular; categoria 3 – moderadamente irregular; categoria 4 – muito irregular. Relativamente à coloração, foi avaliada como: categoria 1 – homogénea; categoria 2 – ligeiramente heterogénea; categoria 3 – moderadamente heterogénea; categoria 4 – muito heterogénea (Tabela 1).

Tabela 1 – Critérios microscópicos e respetivas escalas utilizados na avaliação histológica do cristalino.

Parâmetro	Presença	Localização	Configuração	Heterogeneidade
Glóbulos	1-7	Centrais; Periféricos; Mista (centrais e periféricos)	-	-
Vacúolos			-	-
Fendas		-	-	-
Separação capsular anterior/posterior		-	-	-
Material proteináceo subcapsular		-	-	-
Fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino		-	-	-
Forma do cristalino	-	-	1-4	-
Coloração do cristalino	-	-	-	1-4

Nota: Escala de 1 a 7, na qual categoria 1 – 0%; categoria 2 – 1 a 5%; categoria 3 – 6 a 25%; categoria 4 – 26 a 50%; categoria 5 – 51 a 75%; categoria 6 – 76 a 99% e categoria 7 – 100%.

Escala de 1 a 4 para configuração da forma: categoria 1 – regular; categoria 2 – ligeiramente irregular; categoria 3 – moderadamente irregular; categoria 4 – muito irregular.

Escala de 1 a 4 para heterogeneidade da coloração do cristalino: categoria 1 – homogénea; categoria 2 – ligeiramente heterogénea; categoria 3 – moderadamente heterogénea; categoria 4 – muito heterogénea.

Recorreu-se a um caso de catarata congénita, existente no arquivo do serviço de Anatomia Patológica do CHUSJ, para comparação.

2.5. Análise estatística

Posteriormente, foi efetuada análise descritiva e testes estatísticos utilizando o *software* SPSS®, versão 28.0, com um intervalo de confiança de 95%.

A distribuição dos resultados não cumpria critérios de normalidade, tendo sido utilizado o teste não paramétrico *Mann-Whitney* para duas amostras independentes, de forma a efetuar a comparação entre dois grupos (Formaldeído a 4% com incisão vs Formaldeído a 4% sem incisão; Solução em estudo com incisão vs Solução em estudo sem incisão; Formaldeído a 4% com incisão vs Solução com incisão e Formaldeído a 4% sem incisão vs Solução sem incisão) em cada parâmetro, com o objetivo de verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os dois fixadores e/ou técnicas de fixação.

De modo a verificar se existiam diferenças estatísticas significativas entre os quatro grupos em cada parâmetro, foi utilizado o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra

Neste projeto foram utilizados 32 olhos provenientes de 16 fetos de IMG com idades gestacionais entre as 11 e as 24 semanas, com mediana de 18,5 semanas. Dos 32 olhos, 16 foram fixados em formaldeído a 4% (8 com incisão na esclerótica) e 16 foram fixados numa solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% (8 com incisão na esclerótica).

3.2. Avaliação macroscópica

Na avaliação macroscópica, a média dos diâmetros oculares foi de 8,97x8,28x8,28 mm, respetivamente os diâmetros ântero-posteriores, latero-mediais e súpero-interiores (Gráfico 1). O comprimento médio do nervo ótico foi de 4,64 mm e a córnea de 4,44x4,5 mm de diâmetros médios, respetivamente horizontal e vertical (Gráfico 1). Foi identificado um maior enrijecimento dos olhos nos casos fixados com a solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%, comparativamente com os olhos fixados com formaldeído a 4%, não se tendo verificado alterações da consistência entre os casos em que foram efetuadas as incisões na esclerótica e os restantes.

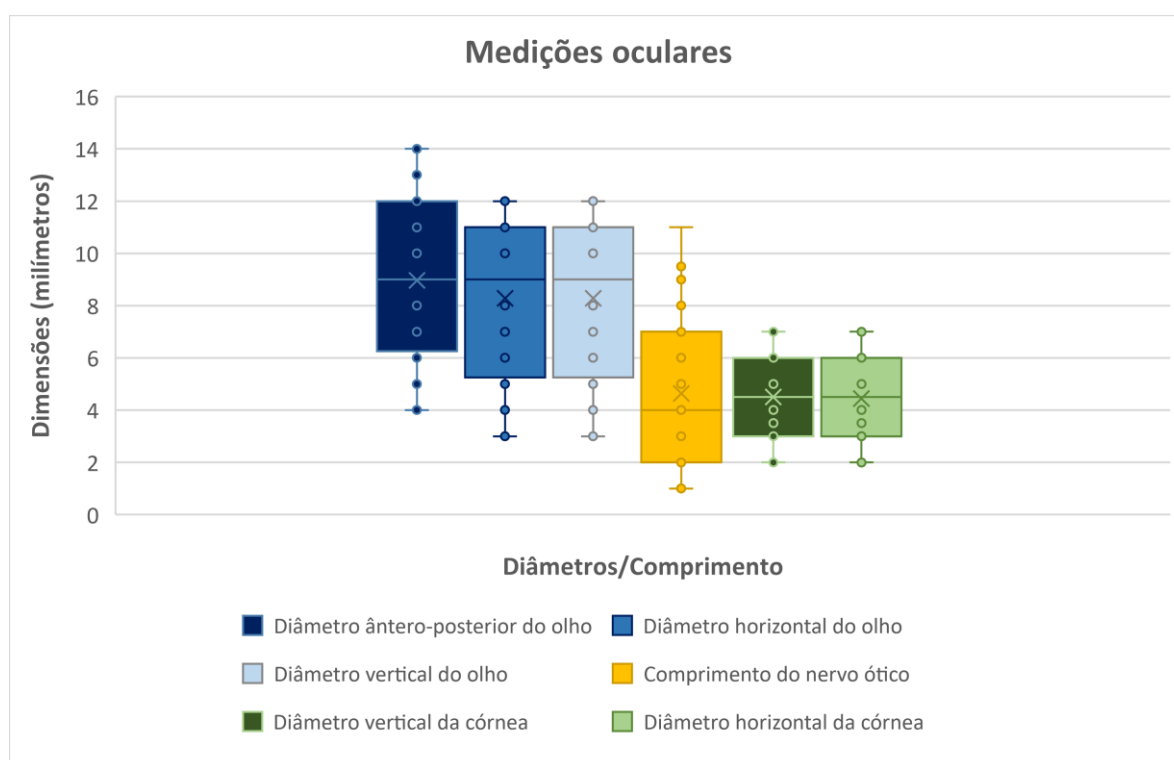


Gráfico 1- Representação gráfica da distribuição dos valores obtidos nas medições oculares.

Na descrição macroscópica dos segmentos anterior e posterior não se verificaram alterações em nenhum dos casos. Em todos os casos, a córnea e o cristalino mostraram-se translúcidos e a íris regular. Ao exame de transiluminação antes e após a etapa da fixação, o cristalino mostrou-se transparente em todos dos casos.

3.3. Avaliação histológica

Na avaliação histológica foi avaliada a frequência (nas categorias previamente definidas) de cada parâmetro em cada um dos grupos. A distribuição de cada parâmetro está resumida na Tabela 2, assim como o resultado dos testes estatísticos realizados (intervalo de confiança de 95%).

Tabela 2 - Estatística descritiva e valores de p (Teste de Kruskal-Wallis) para todos os parâmetros histológicos analisados.

Parâmetro	Estatística descritiva (%)				Valor de p
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	
Glóbulos	Categoria 1 – 12,5% Categoria 2 – 37,5% Categoria 3 – 25,0% Categoria 4 – 12,5% Categoria 6 – 12,5%	Categoria 2 – 87,5% Categoria 3 – 12,5%	Categoria 1 – 25,0% Categoria 2 – 37,5% Categoria 3 – 37,5%	Categoria 1 – 33,3% Categoria 2 – 16,7% Categoria 3 – 33,3% Categoria 4 – 16,7%	0,708
Vacúolos	Categoria 3 – 50,0% Categoria 4 – 37,5% Categoria 5 – 12,5%	Categoria 3 – 75,0% Categoria 4 – 12,5% Categoria 5 – 12,5%	Categoria 2 – 12,5% Categoria 3 – 37,5% Categoria 4 – 37,5% Categoria 7 – 12,5%	Categoria 2 – 16,7% Categoria 3 – 16,7% Categoria 4 – 50,0% Categoria 5 – 16,7%	0,818
Fendas	Categoria 2 – 12,5% Categoria 5 – 25,0% Categoria 6 – 62,5%	Categoria 3 – 12,5% Categoria 4 – 25,0% Categoria 5 – 12,5% Categoria 6 – 37,5% Categoria 7 – 12,5%	Categoria 4 – 37,5% Categoria 5 – 25,0% Categoria 6 – 12,5% Categoria 7 – 25,0%	Categoria 4 – 16,7% Categoria 5 – 66,7% Categoria 6 – 16,7%	0,839
Separação capsular anterior/posterior	Categoria 3 – 12,5% Categoria 4 – 12,5% Categoria 5 – 50,0% Categoria 6 – 12,5% Categoria 7 – 12,5%	Categoria 1 – 25,0% Categoria 3 – 12,5% Categoria 4 – 12,5% Categoria 5 – 12,5% Categoria 6 – 25,0%	Categoria 3 – 37,5% Categoria 4 – 25,0% Categoria 6 – 25,0% Categoria 7 – 12,5%	Categoria 3 – 16,7% Categoria 4 – 33,3% Categoria 5 – 16,7% Categoria 6 – 16,7% Categoria 7 – 16,7%	0,646
Material proteináceo	Categoria 1 – 75,0% Categoria 3 – 12,5% Categoria 4 – 12,5%	Categoria 1 – 87,5% Categoria 2 – 12,5%	Categoria 1 – 100%	Categoria 1 – 100%	0,299
Fragmentação da cápsula e epitélio	Categoria 2 – 12,5% Categoria 3 – 12,5% Categoria 4 – 25,0% Categoria 5 – 37,5% Categoria 7 – 12,5%	Categoria 1 – 25,0% Categoria 2 – 12,5% Categoria 4 – 12,5% Categoria 5 – 12,5% Categoria 6 – 37,5%	Categoria 2 – 12,5% Categoria 3 – 25,0% Categoria 4 – 25,0% Categoria 5 – 12,5% Categoria 6 – 12,5% Categoria 7 – 12,5%	Categoria 1 – 16,7% Categoria 4 – 50,0% Categoria 5 – 16,7% Categoria 7 – 16,7%	0,991
Alteração da forma	Categoria 1 – 62,5% Categoria 2 – 25,0% Categoria 3 – 12,5%	Categoria 1 – 62,5% Categoria 2 – 25,0% Categoria 3 – 12,5%	Categoria 1 – 50,0% Categoria 2 – 25,0% Categoria 3 – 25,0%	Categoria 1 – 66,7% Categoria 2 – 33,3%	0,835
Heterogeneidade da coloração	Categoria 1 – 12,5% Categoria 2 – 37,5% Categoria 3 – 37,5% Categoria 4 – 12,5%	Categoria 1 – 37,5% Categoria 2 – 25,0% Categoria 3 – 37,5%	Categoria 1 – 25,0% Categoria 2 – 50,0% Categoria 3 – 12,5% Categoria 4 – 12,5%	Categoria 1 – 33,3% Categoria 2 – 66,7%	0,379

Nota: Escala de 1 a 7, na qual categoria 1 – 0%; categoria 2 – 1 a 5%; categoria 3 – 6 a 25%; categoria 4 – 26 a 50%; categoria 5 – 51 a 75%; categoria 6 – 76 a 99% e categoria 7 – 100%.

Escala de 1 a 4 para configuração da forma: categoria 1 – regular; categoria 2 – ligeiramente irregular; categoria 3 – moderadamente irregular; categoria 4 – muito irregular.

Escala de 1 a 4 para heterogeneidade da coloração do cristalino: categoria 1 – homogênea; categoria 2 – ligeiramente heterogênea; categoria 3 – moderadamente heterogênea; categoria 4 – muito heterogênea.

Grupo 1 – olhos fixados em formaldeído a 4% sem efetuar a técnica de incisão na esclerótica.

Grupo 2 – olhos fixados em formaldeído a 4% em associação com a técnica.

Grupo 3 – olhos fixados na solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% sem efetuar a técnica.

Grupo 4 – olhos fixados na solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% em associação com a técnica de incisão na esclerótica

3.3.1. Glóbulos

Verificou-se a presença de glóbulos em 83,3% dos casos, sendo a categoria 2 (1 a 5%) a que obteve maior percentagem de casos (46,7%), não se tendo identificado casos nas categorias 5 e 7 em nenhum dos grupos. A distribuição relativa dos casos por categoria, de cada um dos grupos, está ilustrada no Gráfico 2.

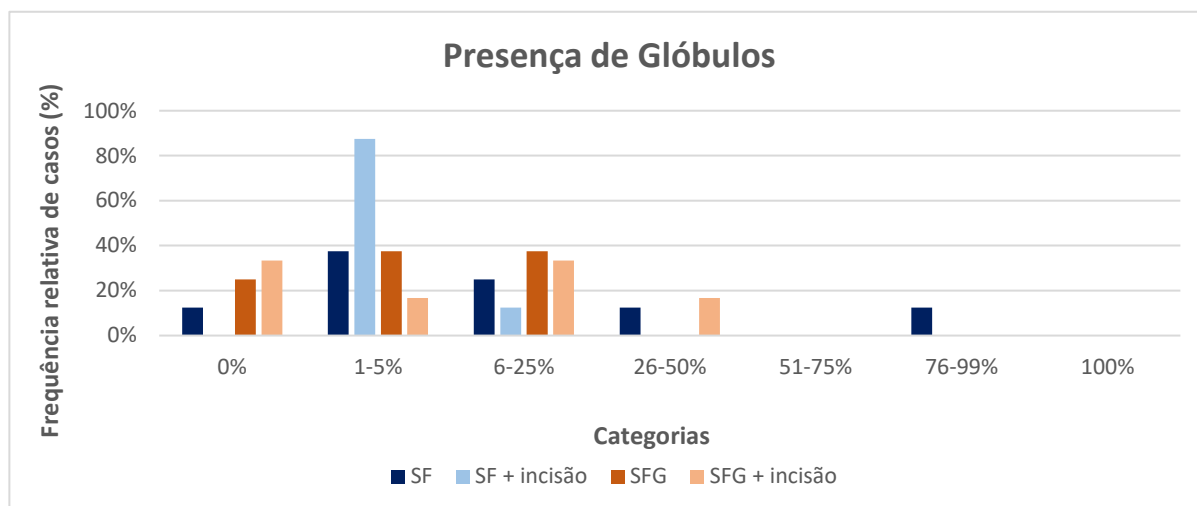


Gráfico 2 - Representação gráfica da distribuição de casos pelas diferentes categorias, relativamente à presença do parâmetro glóbulos, sendo SF - Formaldeído a 4% e SFG - Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

Relativamente à presença de glóbulos nos olhos fixados com formaldeído a 4% sem efetuar a técnica de incisão (grupo 1), a categoria 2 (1 a 5%) corresponde a 37,5% dos casos e a categoria 3 (6-25%) a 25%. Não foram identificados glóbulos (categoria 1) em 12,5% dos casos e os restantes casos distribuíram-se nas categorias 4 e 6 (12,5% em cada).

Para os olhos fixados em formaldeído a 4%, mas em associação com a técnica de incisão (grupo 2), identificaram-se glóbulos em todos os olhos, tendo sido encontrados na categoria 2 (1 a 5%) em 87,5% dos casos e os restantes 12,5% na categoria 3 (6 a 25%). Não se identificaram casos sem glóbulos (categoria 1), mas também não foram identificados casos com percentagens mais elevadas de glóbulos, respetivamente nas categorias 4, 5, 6 e 7.

Nos olhos fixados na solução em estudo sem técnica de incisão (grupo 3), a presença de glóbulos não foi observada em 25,0% dos casos (categoria 1). A categoria 2 (1 a 5%) correspondeu a 37,5% dos casos, assim como a categoria 3 (6 a 25%).

No grupo 4 (solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% com técnica de incisão na esclerótica) verificou-se a ausência de glóbulos em 33,3% dos casos (categoria 1). Foram também identificados glóbulos em 33,3% dos olhos na categoria 3 (6 a 25%), enquanto as

categorias 2 (1 a 5%) e 4 (26 a 50%) correspondem a 16,7% dos casos, cada uma. Não foram identificados casos nas categorias mais elevadas (5, 6 e 7).

Constatou-se que, nos grupos em que os olhos foram fixados pela solução em estudo/ com incisão, existia uma maior percentagem de casos sem glóbulos ou com menor percentagem dos mesmos. Efetuou-se o teste estatístico *Mann-Whitney*, tendo-se obtido o valor de p de 0,350 quando comparados os grupos sem técnica de incisão (grupo 1 vs grupo 3) e o valor de p de 0,719, quando comparados os grupos nos quais se efetuou a técnica de incisão (grupo 2 vs grupo 4), o que significa que, embora haja menos casos com glóbulos ao utilizar a solução em estudo, não foi identificada relação estatística entre eles. Foi efetuado o teste estatístico *Kruskal-Wallis*, tendo-se obtido o valor de p de 0,708, não se tendo, portanto, verificado diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos neste parâmetro.

Em relação à localização dos glóbulos no cristalino, observaram-se glóbulos com distribuição periférica em 44,0% dos casos, com distribuição mista (central e periférica) em 32,0% e em 24,0% com distribuição central. Foi efetuado o teste estatístico *Kruskal-Wallis*, tendo-se obtido o valor de p de 0,505, não se tendo, portanto, verificado diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos a localização dos glóbulos.

Após avaliação da distribuição global dos resultados apresentamos a distribuição dos mesmos distribuída utilizando o *cut-off* de 5% (categorias 1 e 2 vs restantes categorias) e para o *cut-off* de 25% (categorias 1, 2 e 3 vs restantes categorias) para os glóbulos, tornando-se mais evidente o maior número de casos com ausência ou pouca quantidade de glóbulos nos grupos 2 e 3 (Gráficos 3 e 4), embora não se tivesse verificado diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos neste parâmetro ($p = 0,394$ e $p = 0,268$, respetivamente).

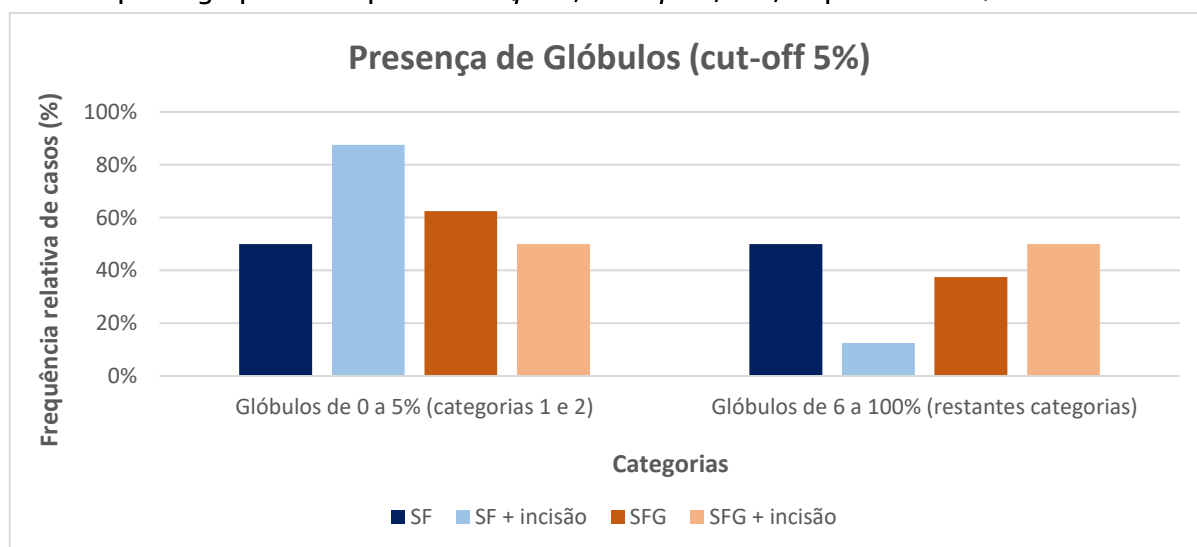


Gráfico 3 - Representação gráfica da distribuição do parâmetro glóbulos em cada um dos grupos, utilizando o *cut-off* de 5%, sendo SF - Formaldeído a 4% e SFG - Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

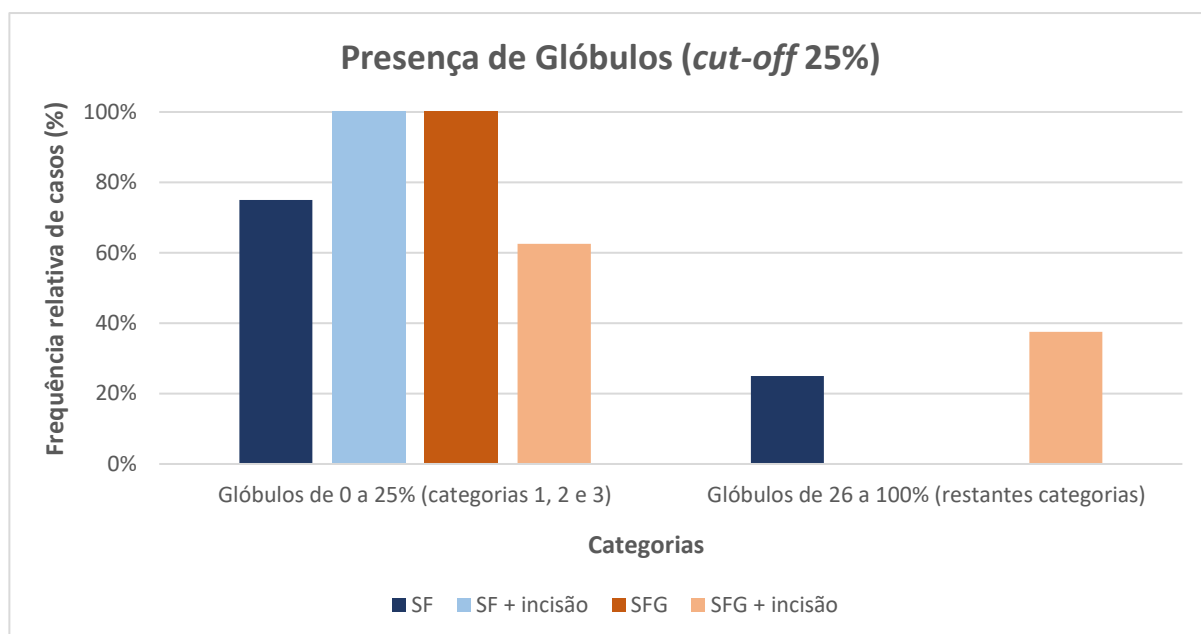


Gráfico 4 – Representação gráfica da distribuição do parâmetro vacúolos em cada um dos grupos, utilizando o cut-off de 25%, sendo SF - Formaldeído a 4% e SFG - Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

3.3.2. Vacúolos

Relativamente à avaliação histológica do parâmetro vacúolos, estes foram identificados em todos os casos, de cada um dos grupos, sendo que a categoria com maior percentagem de casos (46,7%) foi a categoria 3 (6 a 25%), não tendo sido identificados casos em nenhum dos grupos nas categorias 1 e 6. A distribuição relativa dos casos por categoria, de cada um dos grupos, está ilustrada no Gráfico 5.

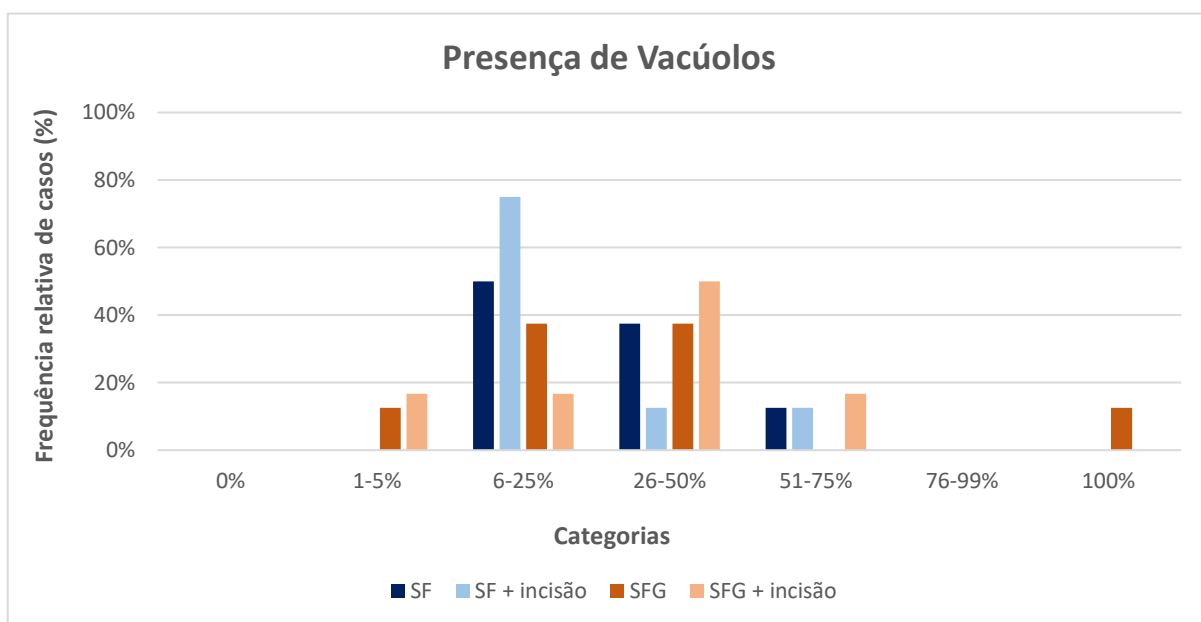


Gráfico 5 - Representação gráfica da distribuição de casos pelas diferentes categorias, relativamente à de presença do parâmetro vacúolos, SF - Formaldeído a 4% e SFG - Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

Relativamente à presença de vacúolos nos olhos fixados em formaldeído a 4% sem a técnica de incisão na esclerótica (grupo 1), a categoria 3 (6 a 25%) corresponde a 50,0% dos casos, a categoria 4 (26 a 50%) a 37,5% e a categoria 5 (51 a 75%) a 12,5%.

Nos olhos fixados em formaldeído a 4% em associação com a técnica de incisão (grupo 2), a categoria 3 (6 e 25%) correspondeu a 75,0% dos casos e os restantes casos distribuíram-se pelas categorias 4 e 5 (12,5% em cada).

Para os olhos fixados na solução em estudo sem técnica de incisão (grupo 3), a categoria 3 (6 a 25%) correspondeu a 37,5% dos casos, assim como a categoria 4 (26 a 50%). Os restantes casos distribuíram-se pelas categorias 2 e 7 (12,5% em cada).

No grupo 4 (solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% com técnica de incisão) verificou-se que 50,0% dos olhos avaliados encontravam-se na categoria 4 (26 a 50%). Os restantes casos distribuíram-se pelas categorias 2, 3 e 5 (16,7% em cada).

Constatou-se que, nos grupos fixados na solução em estudo existia uma maior percentagem de casos em categorias de valor percentual mais baixo. Efetuou-se o teste estatístico *Mann-Whitney*, tendo-se obtido o valor de p de 0,866 quando comparados os grupos sem técnica de incisão (grupo 1 vs grupo 3) e 0,402 entre os grupos nos quais se efetuou a técnica de incisão (grupo 2 vs grupo 4), o que significa que, embora haja menos casos com vacúolos ao utilizar a solução em estudo, não foi identificada relação estatisticamente significativa entre eles. Foi efetuado o teste estatístico *Kruskal-Wallis* (valor de p de 0,818) não se tendo verificado diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos neste parâmetro.

Em relação à localização dos vacúolos no cristalino observou-se que em 62,1% dos casos os vacúolos tinham uma distribuição periférica e em 37,9% mista (central e periférica). Foi efetuado o teste estatístico *Kruskal-Wallis* cujo valor de p foi de 0,473 não se tendo verificado diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos neste parâmetro.

Após avaliação da distribuição dos resultados apresentamos a distribuição dos mesmos distribuída utilizando o *cut-off* de 5% para os vacúolos (categoria 1 e 2 vs restantes categorias) e o *cut-off* de 50% (categorias 1, 2, 3 e 4 vs restantes categorias), tornando-se mais evidente o número de casos com pouca quantidade de vacúolos nos grupos 3 e 4 (Gráfico 6 e 7), embora não se tivesse verificado diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos neste parâmetro ($p = 0,483$ e $p = 0,995$, respetivamente).

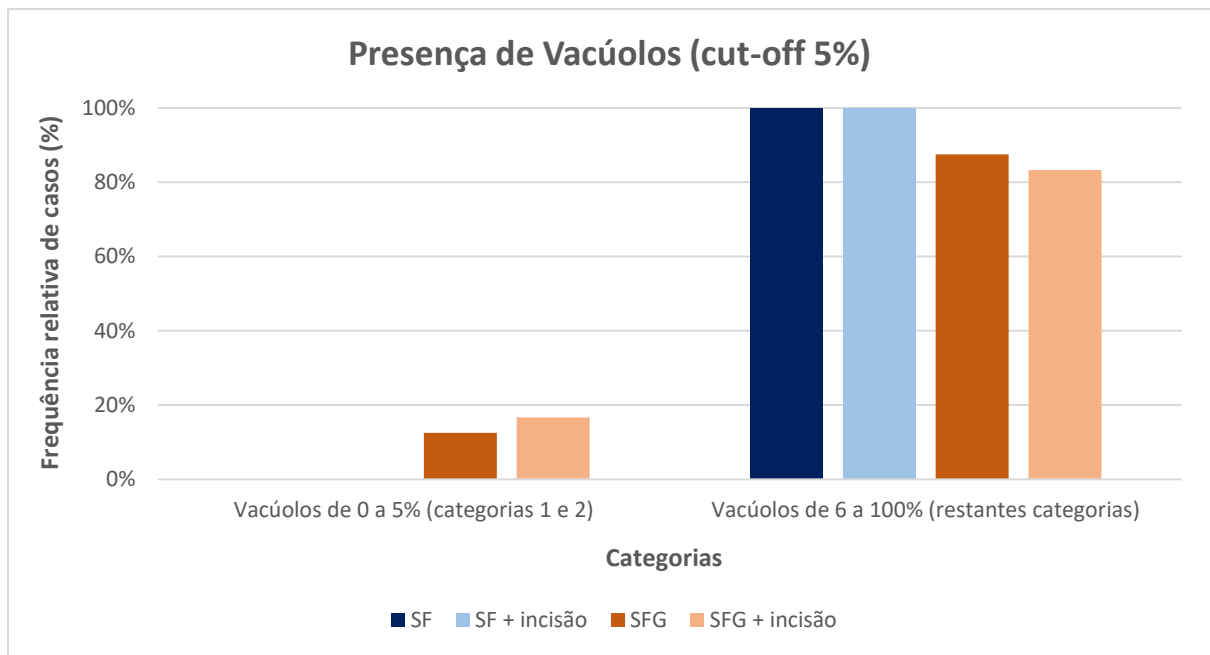


Gráfico 6 – Representação gráfica da distribuição do parâmetro vacúolos em cada um dos grupos, utilizando o cut-off de 5%, SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

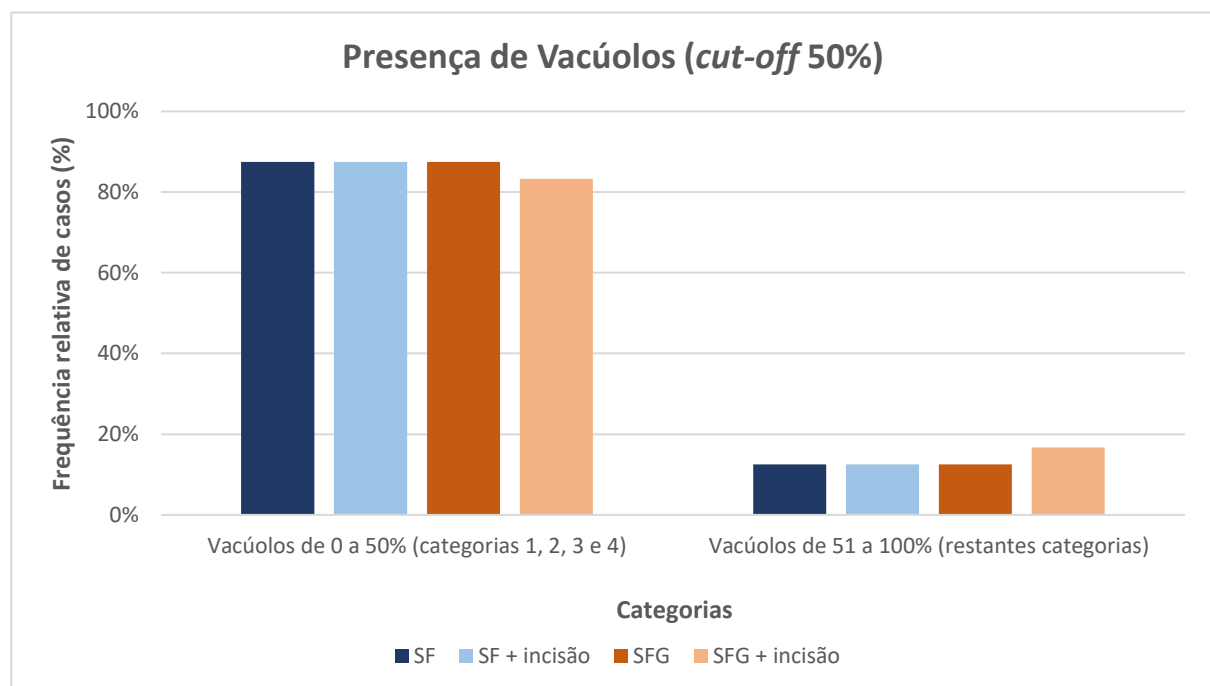


Gráfico 7 – Representação gráfica da distribuição do parâmetro vacúolos em cada um dos grupos, utilizando o cut-off de 50%, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

3.3.3. Fendas

Neste parâmetro verificou-se a presença do mesmo em todos os casos dos quatro grupos, sendo que a categoria 6 (76 a 99%) foi a que obteve maior percentagem de casos (33,3%). A distribuição relativa dos casos por categoria, de cada um dos grupos, está ilustrada no Gráfico 8.

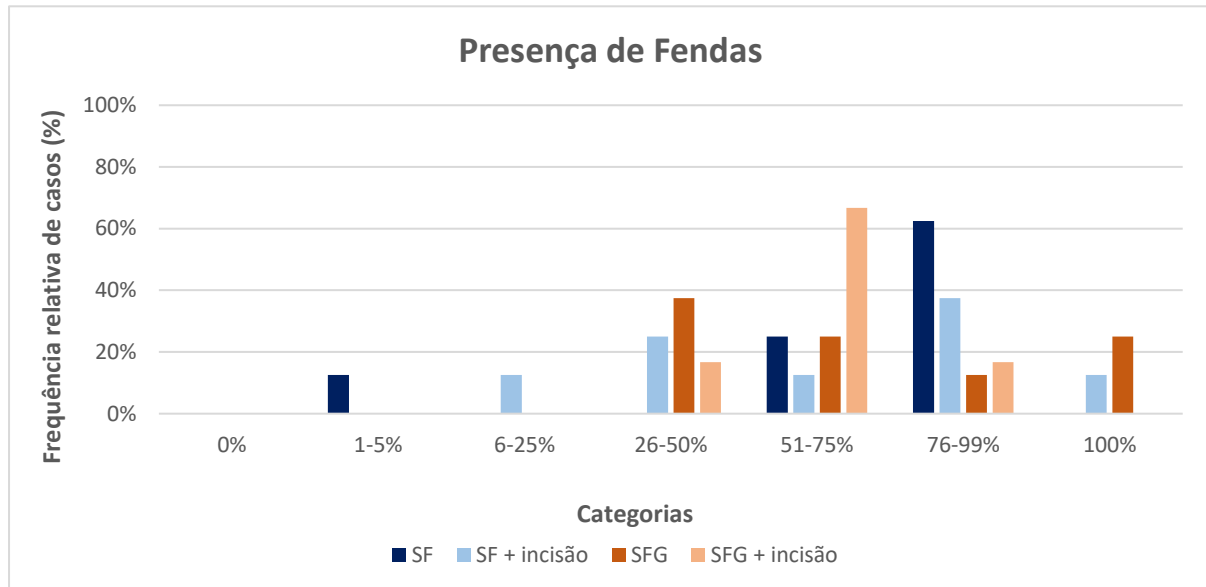


Gráfico 8 - Representação gráfica da distribuição de casos pelas diferentes categorias, relativamente à presença do parâmetro fendas, sendo SF - Formaldeído a 4% e SFG - Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

Nos olhos fixados em formaldeído a 4% sem realizar técnica de incisão na esclerótica (grupo 1), a categoria 6 (76 e 99%) corresponde a 62,5% dos casos, a categoria 5 (51 e 75%) a 25,0% e a categoria 2 (1 e 5%) a 12,5%.

Para os olhos fixados em formaldeído a 4% em associação com técnica de incisão na esclerótica (grupo 2), a categoria 6 (76 a 99%) correspondeu a 37,5% dos casos e a categoria 4 (26 a 50%) a 25,0%. A categoria 3 (6 a 25%) correspondeu a 12,5% dos casos neste grupo, assim como, as categorias 5 (51 a 75%) e 7 (100%).

Nos olhos fixados na solução em estudo sem técnica de incisão (grupo 3), a presença de fendas na categoria 4 (26 e 50%) correspondeu a 37,5% dos casos. A categoria 5 (51 a 75%) correspondeu a 25,0% dos casos, assim como, a categoria 7 (100%), enquanto a categoria 6 (76 a 99%) correspondeu a 12,5% dos casos.

No grupo 4 (solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% em associação com a técnica de incisão) verificou-se que a categoria 5 (51 e 75%) correspondeu a 66,7% dos casos, enquanto as categorias 4 (26 a 50%) e 6 (76 a 99%) constituíram, cada uma, a 16,7% dos casos.

Constatou-se que, nos olhos fixados na solução em estudo em associação com a técnica de incisão na esclerótica, existia uma menor percentagem de casos com maior percentagem de fendas. No teste estatístico de *Mann-Whitney*, obteve-se o valor de p de 0,703 quando comparados os grupos sem técnica de incisão (grupo 1 vs grupo 3) e 0,737 entre os grupos nos quais se efetuou a técnica de incisão (grupo 2 vs grupo 4), o que significa que, embora haja menos casos nas categorias com valor percentual mais elevado para a presença de fendas ao utilizar a solução em estudo, não foi identificada relação estatística entre eles. Foi efetuado o teste estatístico *Kruskal-Wallis*, tendo sido o valor de p de 0,839, não se tendo, desta forma, identificado diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos neste parâmetro.

Após avaliação da distribuição dos resultados apresentamos a distribuição dos mesmos distribuída utilizando o *cut-off* de 50% para as fendas (categoria 1 e 2 vs restantes categorias), tornando-se mais evidente o menor número de casos com maior quantidade de fendas nos grupos 2 e 3 (Gráfico 9), embora não se tivesse verificado diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos neste parâmetro ($p = 0569$).

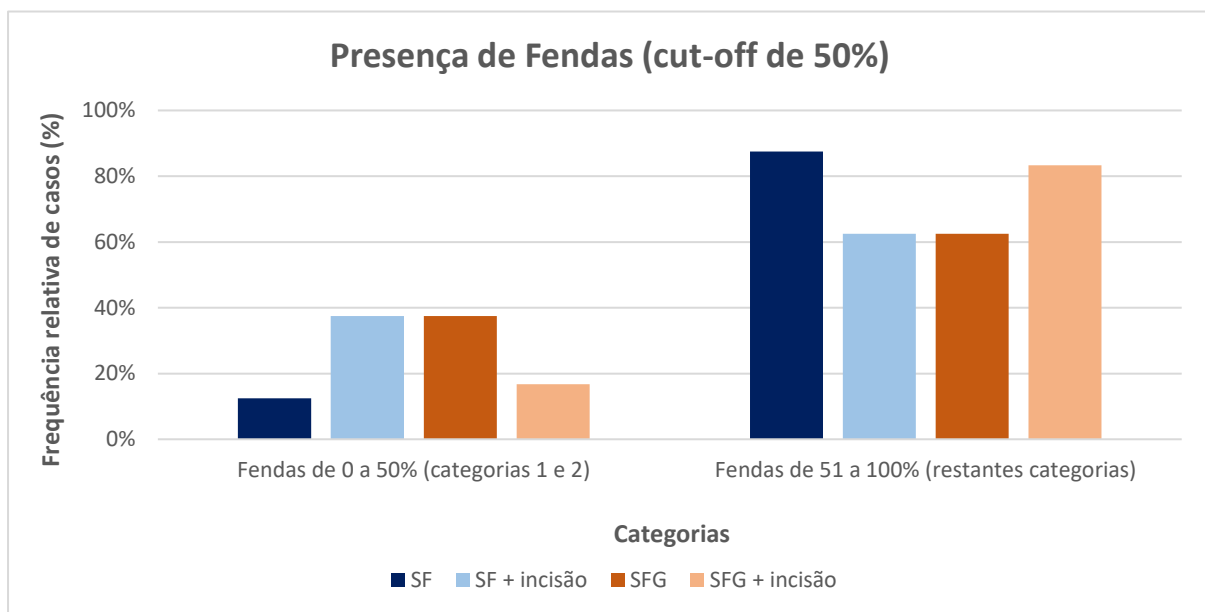


Gráfico 9 – Representação gráfica da distribuição do parâmetro fendas em cada um dos grupos, utilizando o *cut-off* de 50%, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

3.3.1. Separação capsular anterior/posterior

Observou-se a presença de separação capsular anterior/posterior em 100% dos casos de todos os grupos, exceto no grupo dos olhos fixados com formaldeído a 4% em associação com a técnica de incisão (grupo 2) que foi em 75% dos casos. Não se identificaram casos em nenhum dos grupos na categoria 2 (1 a 5%). A distribuição relativa dos casos por categoria, de cada um dos grupos, está ilustrada no Gráfico 10.

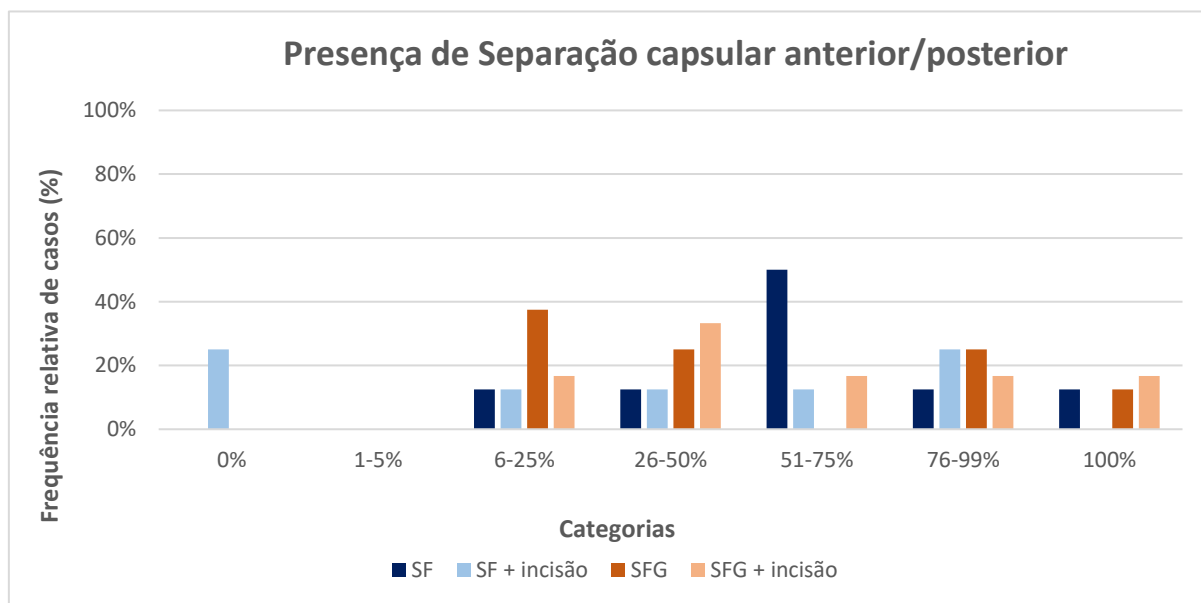


Gráfico 10 – Representação gráfica da distribuição de casos pelas diferentes categorias, relativamente à presença do parâmetro separação capsular anterior/posterior, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

Relativamente à presença de separação capsular anterior/posterior nos olhos fixados em formaldeído a 4% sem efetuar técnica de incisão (grupo 1), a categoria 5 (51 a 75%) correspondeu a 50,0% dos casos. A categoria 3 (6 a 25%) correspondeu a 12,5% dos casos, assim como, as categorias 4 (26 a 50%), 6 (76 a 99%) e 7 (100%).

Nos olhos fixados em formaldeído a 4% em associação com a técnica de incisão (grupo 2), a presença de separação capsular não foi identificada em 25,0% dos casos (categoria 1). Também com uma percentagem de 25,0% dos olhos avaliados neste grupo temos a categoria 6 (76 a 99%), enquanto as categorias 3 (6 a 25%), 4 (26 a 50%) e 5 (51 a 75%) correspondem a 12,5% dos casos, cada uma.

Para os olhos fixados na solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% sem técnica de incisão na esclerótica (grupo 3), a categoria 3 (6 a 25%) correspondeu a 37,5% dos casos. As categorias 4 (26 a 50%) e 6 (76 a 99%) representaram, cada uma, 25,0% dos casos, enquanto a categoria 7 (100%) correspondeu a 12,5%.

No grupo 4 (solução em estudo em associação com a técnica de incisão), a categoria 4 (26 a 50%) correspondeu a 33,3% dos casos. As categorias 3 (6 a 25%), 5 (51 a 75%), 6 (76 a 99%) e 7 (100%) corresponderam a 16,7% dos casos neste grupo, cada uma.

Constatou-se que, nos grupos em que foi efetuada a incisão na esclerótica, a percentagem de casos nas categorias mais baixas foi maior, comparativamente aos grupos sem incisão. Efetuou-se o teste estatístico *Mann-Whitney*, tendo-se obtido o valor de p de 0,452 quando comparados os grupos com diferentes fixadores sem técnica de incisão (grupo 1 vs grupo 3) e o valor de p de 0,384, quando comparados os grupos com diferentes fixadores nos quais foi efetuada a técnica de incisão (grupo 2 vs grupo 4), o que significa que, embora haja menos casos com separação capsular anterior/posterior ao efetuar a técnica de incisão na esclerótica, não foi identificada relação estatística entre eles. Foi efetuado o teste estatístico *Kruskal-Wallis*, tendo sido o valor de p de 0,646, não se tendo, desta forma, identificado diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos neste parâmetro.

Após avaliação da distribuição dos resultados apresentamos a distribuição dos mesmos distribuída utilizando o *cut-off* de 5% para a separação capsular anterior/posterior (categoria 1 e 2 vs restantes categorias), tornando-se mais evidente o maior número de casos com ausência ou pouca quantidade de separação capsular anterior/posterior no grupo 2 (Gráfico 11), embora não se tivesse verificado diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos neste parâmetro ($p = 0,102$).

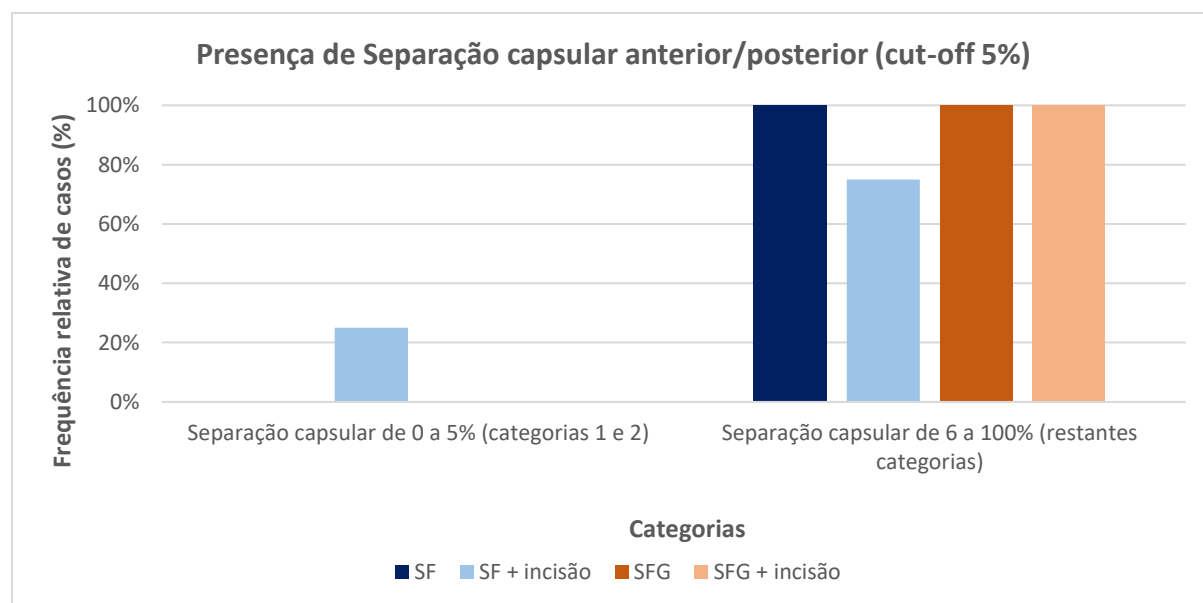


Gráfico 11 - Representação gráfica da distribuição do parâmetro separação capsular anterior/posterior em cada um dos grupos, utilizando o *cut-off* de 5%, sendo SF - Formaldeído a 4% e SFG - Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

3.3.2. Material proteináceo subcapsular

No que diz respeito à deposição de material proteináceo subcapsular, verificou-se a ausência deste parâmetro em 90,0% dos casos de todos os grupos, não se tendo identificado casos em nenhum dos grupos nas categorias 5, 6 e 7. A distribuição relativa dos casos por categoria, de cada um dos grupos, está ilustrada no Gráfico 12.

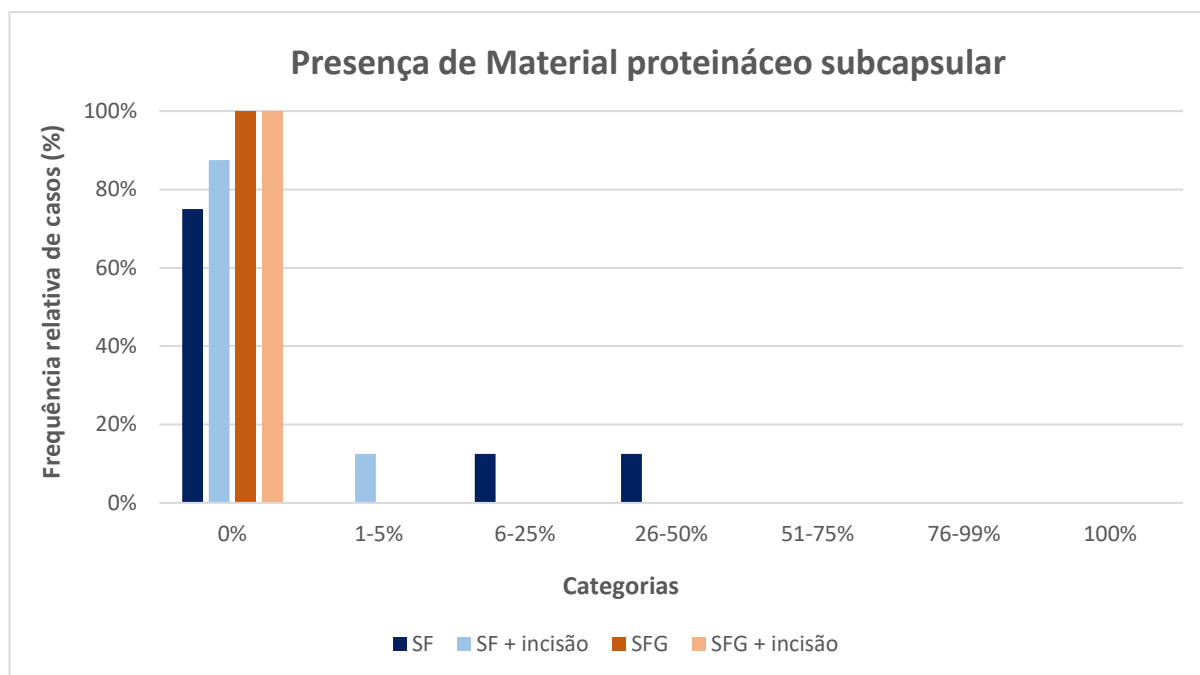


Gráfico 12 - Representação gráfica da distribuição de casos pelas diferentes categorias, relativamente à presença do parâmetro material proteináceo subcapsular, sendo SF - Formaldeído a 4% e SFG - Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

No grupo 1 (olhos fixados em formaldeído a 4% sem efetuar a técnica de incisão) observou-se a ausência de material proteináceo subcapsular (categoria 1) em 75,0% dos olhos. Os restantes casos distribuíram-se nas categorias 3 e 4 (12,5% em cada).

Para os olhos fixados em formaldeído em associação com a técnica de incisão (grupo 2) verificou-se a ausência de deposição deste material em 87,5% dos casos (categoria 1), enquanto a categoria 2 (1 e 5%) correspondeu aos restantes casos (12,5%).

Nos olhos fixados com a solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% (grupos 3 e 4) não foi identificada a deposição de material proteináceo subcapsular no cristalino.

Constatou-se que entre os olhos fixados em formaldeído a 4%, a percentagem de ausência deste artefacto foi maior nos olhos com técnica de incisão associada. Efetuou-se o teste estatístico *Mann-Whitney*, tendo-se obtido o valor de p de 0,144 quando comparados os grupos sem técnica de incisão (grupo 1 vs grupo 3) e o valor de p de 0,386 entre os grupos nos quais se efetuou a técnica de incisão (grupo 2 vs grupo 4), o que significa que, embora não existam

casos com material proteináceo subcapsular ao utilizar a solução em estudo, não foi identificada relação estatística entre eles. Foi efetuado o teste estatístico *Kruskal-Wallis*, tendo-se obtido o valor de p de 0,299, não se tendo, desta forma, identificado diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos neste parâmetro.

Após avaliação da distribuição dos resultados apresentamos a distribuição dos mesmos distribuída utilizando o *cut-off* de 5% para o material proteináceo subcapsular (categoria 1 e 2 vs restantes categorias), tornando-se mais evidente a ausência de casos com maior quantidade de material proteináceo (grupos 3 e 4) (Gráfico 13), embora não se tivesse verificado diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos neste parâmetro ($p = 0,219$).

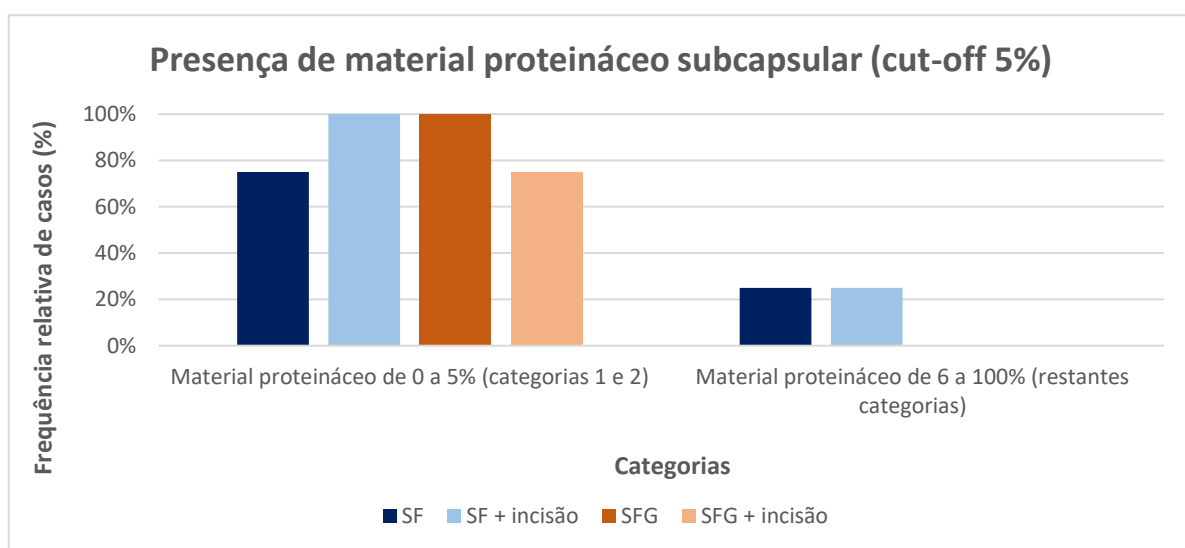


Gráfico 13 – Representação gráfica da distribuição do parâmetro material proteináceo subcapsular em cada um dos grupos, utilizando o *cut-off* de 5%, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

3.3.3. Fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino

No parâmetro fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino verificou-se fragmentação em 90,0% dos casos de todos os grupos, sendo que a categoria 4 (26 a 50%) foi a que obteve maior percentagem de casos (26,7%). A distribuição relativa dos casos por categoria, de cada um dos grupos, está ilustrada no Gráfico 14.

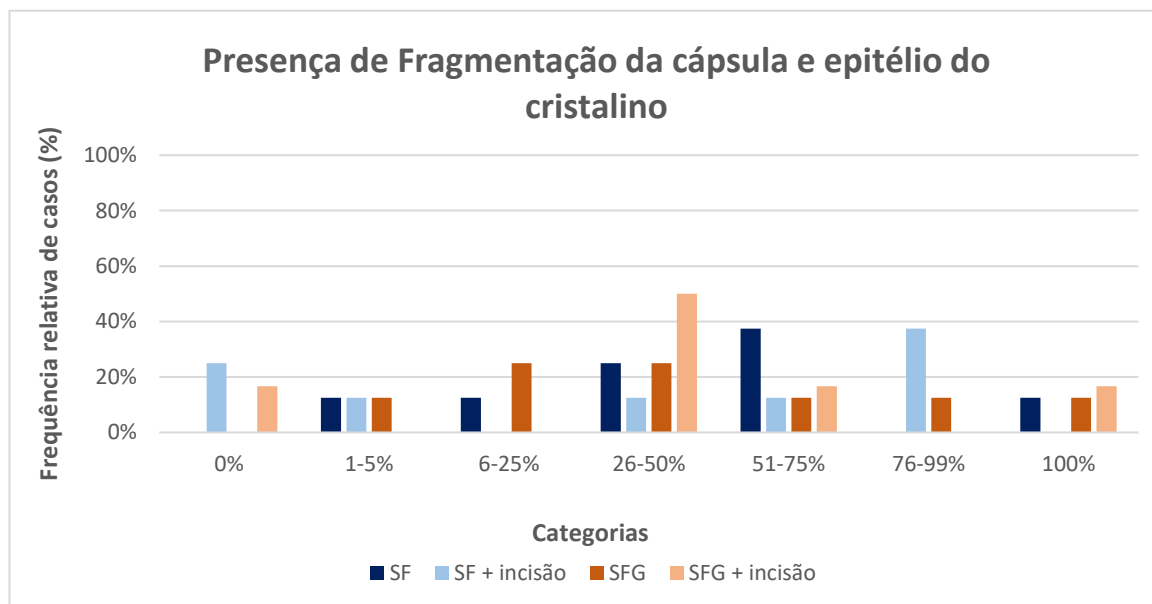


Gráfico 14 – Representação gráfica da distribuição de casos pelas diferentes categorias, relativamente à presença do parâmetro fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino, sendo SF - Formaldeído a 4% e SFG - Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

Relativamente à presença de fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino nos olhos fixados em formaldeído a 4% sem efetuar a técnica de incisão (grupo 1), a categoria 5 (51 a 75%) corresponde a 37,5% dos casos. A categoria 4 (26 a 50%) correspondeu a 25,0% dos casos, enquanto as categorias 2 (1 a 5%), 3 (6 a 25%) e 7 (100%) corresponderam a 12,5% dos casos, cada uma.

No grupo 2 (olhos fixados em formaldeído a 4% em associação com a técnica de incisão), a presença de fragmentação da cápsula e epitélio não se observou em 25,0% dos casos neste grupo (categoria 1). A categoria 6 (76 a 99%) correspondeu a 37,5% dos casos, enquanto os restantes casos distribuíram-se pelas categorias 2, 4 e 5 (12,5% cada uma).

Nos olhos fixados na solução em estudo sem efetuar a técnica de incisão (grupo 3), a categoria 3 (6 a 25%) correspondeu a 25,0% dos casos, assim como, a categoria 4 (26 e 50%). Os restantes casos distribuíram-se pelas categorias 2, 5, 6 e 7 (12,5% cada uma).

Para os olhos em que foi utilizada como fixador a solução em estudo em associação com a técnica de incisão, verificou-se a ausência de fragmentação em 16,7% dos casos neste grupo

(categoria 1). A categoria 4 (26 a 50%) correspondeu a 50,0% dos casos, enquanto as categorias 5 (51 a 75%) e 7 (100%) correspondem a 16,7% dos casos, cada uma.

Constatou-se que, a fragmentação da cápsula e epitélio estava presente em todos os olhos nos quais não foi efetuada a técnica de incisão na esclerótica e que foi nos olhos fixados com a solução em que se observaram a maioria dos casos em categorias mais baixas, relativamente aos outros grupos. Efetuou-se o teste estatístico *Mann-Whitney*, tendo-se obtido o valor de p de 0,789 quando comparados os grupos sem técnica de incisão (grupo 1 vs grupo 3) e 1,000 entre os grupos nos quais se efetuou a técnica de incisão (grupo 2 vs grupo 4), o que significa que, embora haja menos casos com fragmentação da cápsula e do epitélio em categorias com valor percentual mais elevado ao utilizar a solução em estudo, não foi identificada relação estatística entre eles. Foi efetuado o teste estatístico *Kruskal-Wallis*, tendo sido o valor de p de 0,991, não se tendo, desta forma, identificado diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos neste parâmetro.

Após avaliação da distribuição dos resultados apresentamos a distribuição dos mesmos distribuída utilizando o *cut-off* de 5% para a fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino (categoria 1 e 2 vs restantes categorias), tornando-se mais evidente o maior número de casos com ausência ou pouca quantidade de fragmentação da cápsula e epitélio no grupo 2 (Gráfico 15), embora não se tivesse verificado diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos neste parâmetro ($p = 0,497$).

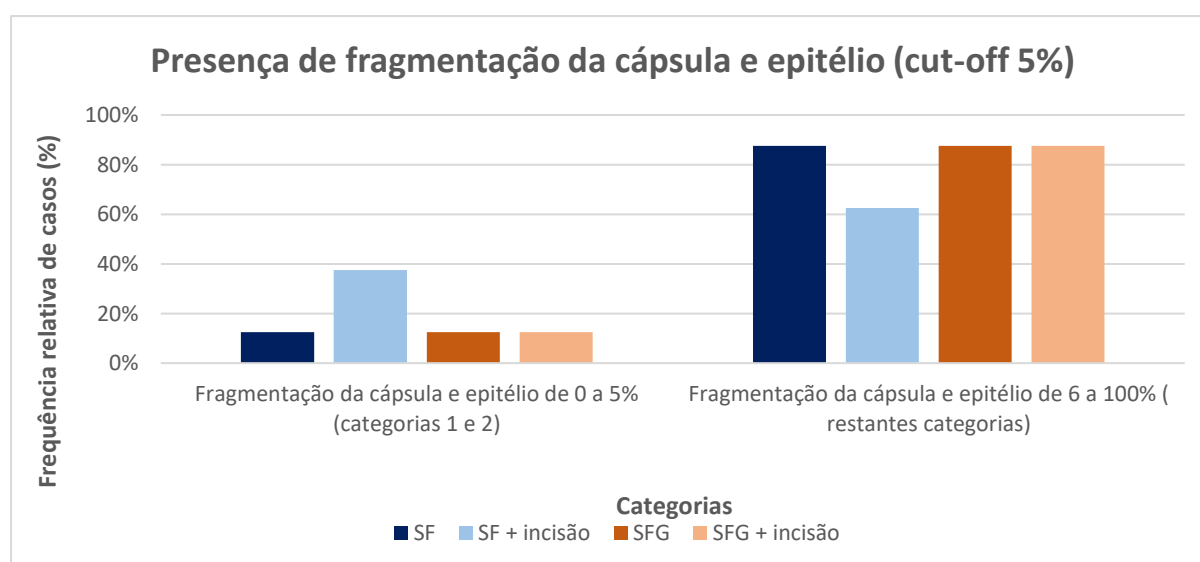


Gráfico 15 – Representação gráfica da distribuição do parâmetro fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino em cada um dos grupos, utilizando o *cut-off* de 5%, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

3.3.4. Alteração da forma do cristalino

Neste parâmetro verificou-se que, apesar de em todos os grupos se verificar alterações na forma do cristalino, este era regular em 60,0% dos casos, não se tendo identificado casos em nenhum dos grupos na categoria 4 (irregular). A distribuição relativa dos casos por categoria, de cada um dos grupos, está ilustrada no Gráfico 16.

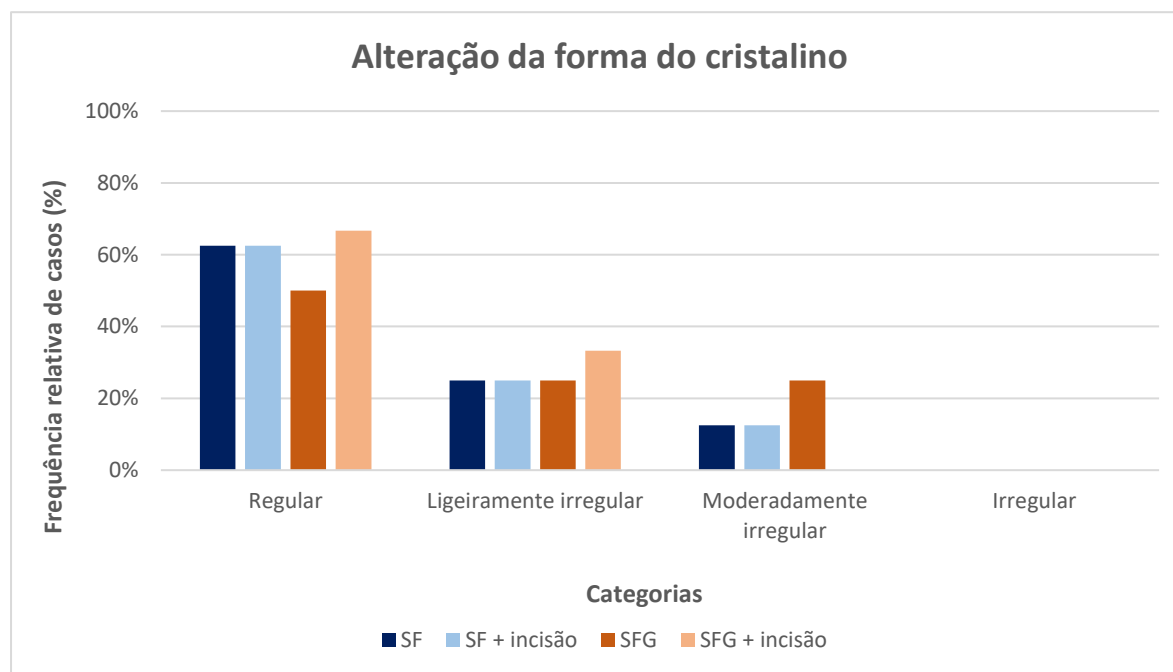


Gráfico 16 - Representação gráfica da distribuição de casos pelas diferentes categorias, relativamente à alteração da forma do cristalino, sendo SF - Formaldeído a 4% e SFG - Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

No grupo 1 (olhos fixados em formaldeído a 4% sem efetuar a técnica de incisão), a forma foi regular em 62,5% dos olhos (categoria 1). A categoria 2 (ligeiramente irregular) correspondeu a 25,0% dos casos, enquanto a categoria 3 (moderadamente irregular) correspondeu a 12,5%. Os mesmos resultados foram observados nos olhos fixados em formaldeído a 4% em associação com a técnica de incisão (grupo 2).

Nos olhos fixados com a solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% sem efetuar a técnica de incisão (grupo 3), a forma mostrou-se regular (categoria 1) em 50,0% dos casos e os restantes distribuíram-se pelas categorias 2 (ligeiramente irregular) e 3 (moderadamente irregular) (25,0% cada uma).

Para os olhos fixados com a solução em estudo em associação com a técnica de incisão (grupo 4), observou-se que a categoria 1 (regular) correspondeu a 66,7% dos casos e a categoria 2 (ligeiramente irregular) a 33,3% dos casos. Não se identificaram casos na categoria 3 (moderadamente irregular).

Constatou-se que os olhos fixados com a solução em estudo em associação com a técnica de incisão na esclerótica apresentaram menor percentagem de alterações da forma, sendo estas de natureza ligeira, apesar de ter sido com este fixador que se verificou uma maior percentagem de casos com alterações moderadas. Efetuou-se o teste estatístico *Mann-Whitney*, tendo-se obtido o valor de p de 0,558 quando comparados os grupos sem técnica de incisão (grupo 1 vs grupo 3) e 0,760 entre os grupos nos quais se efetuou a técnica de incisão (grupo 2 vs grupo 4), o que significa que, embora haja menos casos com alterações na forma do cristalino ao utilizar a solução em estudo, não foi identificada relação estatística entre eles. Foi efetuado o teste estatístico *Kruskal-Wallis*, tendo sido o valor de p de 0,835, não se tendo, desta forma, identificado diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos neste parâmetro.

Após avaliação da distribuição dos resultados apresentamos a distribuição dos mesmos distribuída utilizando o *cut-off* de regular/irregular para a alteração da forma do cristalino (categoria 1 vs restantes categorias), tornando-se mais evidente o menor número de casos com maior severidade de alteração da forma no grupo 4 (Gráfico 17), embora não se tivesse verificado diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos neste parâmetro ($p = 0,925$).

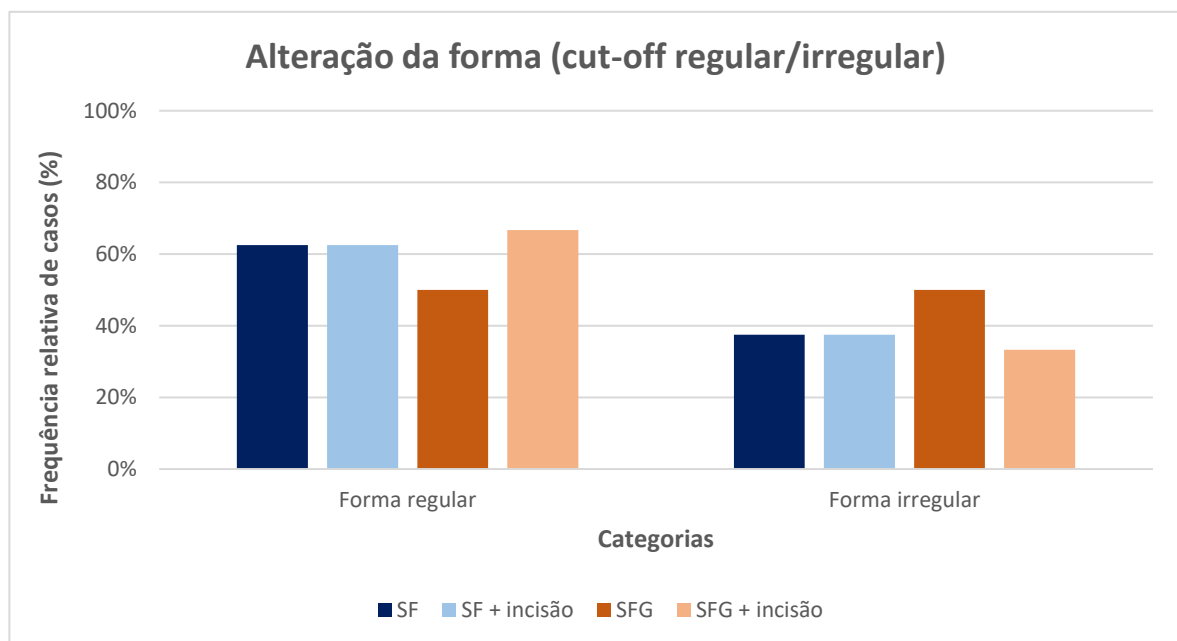


Gráfico 17 - Representação gráfica da distribuição do parâmetro alteração da forma do cristalino em cada um dos grupos, utilizando o *cut-off* de regular/irregular, sendo SF - Formaldeído a 4% e SFG - Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

3.3.5. Heterogeneidade da coloração do cristalino

Relativamente à coloração do cristalino, verificou-se heterogeneidade da coloração em 73,3% de todos os casos dos quatro grupos, sendo que 43,3% de todos os casos apresentou coloração ligeiramente heterogénea. A distribuição relativa dos casos por categoria, de cada um dos grupos, está ilustrada no Gráfico 18.

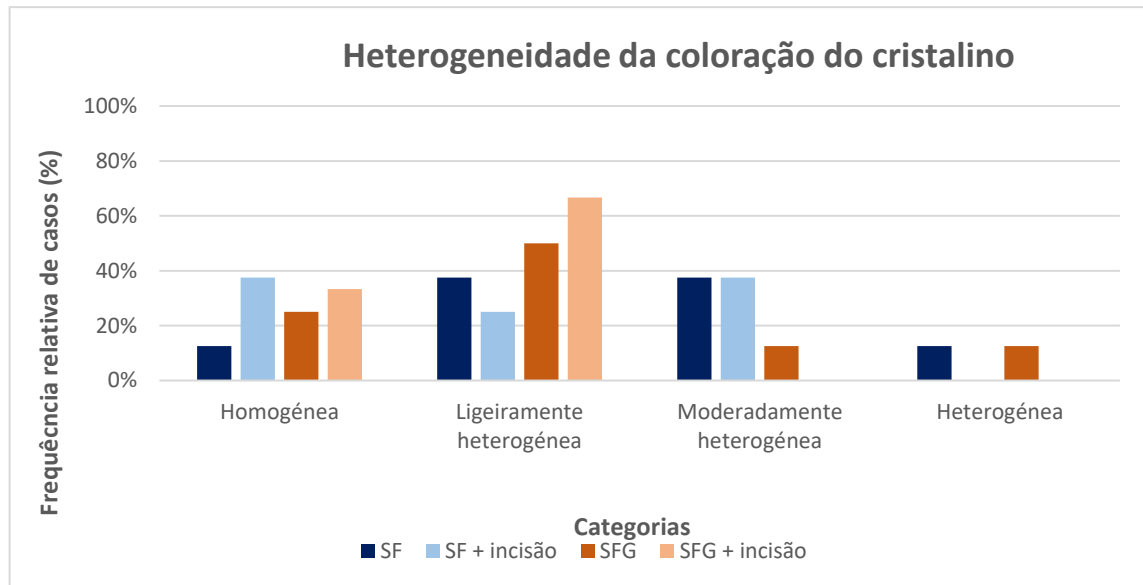


Gráfico 18 - Representação gráfica da distribuição de casos pelas diferentes categorias, relativamente à heterogeneidade da coloração do cristalino, sendo SF - Formaldeído a 4% e SFG - Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

Para os olhos fixados em formaldeído a 4% sem a técnica de incisão na esclerótica (grupo 1), as categorias 2 (ligeiramente heterogénea) e 3 (moderadamente heterogénea) corresponderam a 37,5% dos casos, cada uma. A categoria 1 (homogénea) correspondeu a 12,5% dos casos, assim como, na categoria 4 (heterogénea).

Nos olhos fixados em formaldeído a 4% em associação com a técnica de incisão (grupo 2) observou-se que a categoria 1 (homogénea) correspondeu a 37,5% dos casos, tal como, a categoria 3 (moderadamente heterogénea). A categoria 2 (ligeiramente heterogénea) correspondeu a 25,0% dos olhos neste grupo, não se identificando casos na categoria 4.

Para o grupo 3 (solução em estudo sem técnica de incisão), verificou-se que a categoria 2 (ligeiramente heterogénea) correspondeu a 50,0% dos casos, enquanto a categoria 1 (homogénea) correspondeu a 25,0% dos casos. Os restantes casos distribuíram-se pelas categorias 3 (moderadamente heterogénea) e 4 (heterogénea) (12,5% cada uma).

Nos olhos fixados na solução em estudo em associação com a técnica de incisão (grupo 4), a categoria 2 (ligeiramente heterogénea) correspondeu a 66,7% dos casos e a categoria 1 (homogénea) a 33,3%, não se identificando casos nas categorias 3 e 4.

Constatou-se que, nos olhos nos quais não foi efetuada a técnica de incisão na esclerótica a percentagem de casos com heterogeneidade na coloração do cristalino (categorias elevadas) foi maior, enquanto os olhos fixados na solução em estudo em associação com a técnica de incisão demonstraram apenas alterações ligeiras na coloração. Efetuou-se o teste estatístico *Mann-Whitney*, tendo-se obtido o valor de p de 0,375 quando comparados os grupos sem técnica de incisão (grupo 1 vs grupo 3) e o valor de p de 0,489 entre os grupos nos quais se efetuou a técnica de incisão (grupo 2 vs grupo 4), o que significa que, embora haja mais casos com heterogeneidade na coloração do cristalino quando não se efetuou a técnica de incisão da esclerótica, não foi identificada relação estatística entre eles. Foi efetuado o teste estatístico *Kruskal-Wallis*, tendo-se obtido o valor de p de 0,379, não se tendo, desta forma, identificado diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos neste parâmetro.

Após avaliação da distribuição dos resultados apresentamos a distribuição dos mesmos distribuída utilizando o *cut-off* de homogénea/heterogénea para a heterogeneidade da coloração do cristalino (categoria 1 vs restantes categorias), tornando-se mais evidente o maior número de casos com ausência ou pouca heterogeneidade da coloração nos grupos 2 e 4 (Gráfico 19), embora não se tivesse verificado diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos neste parâmetro ($p = 0,705$).

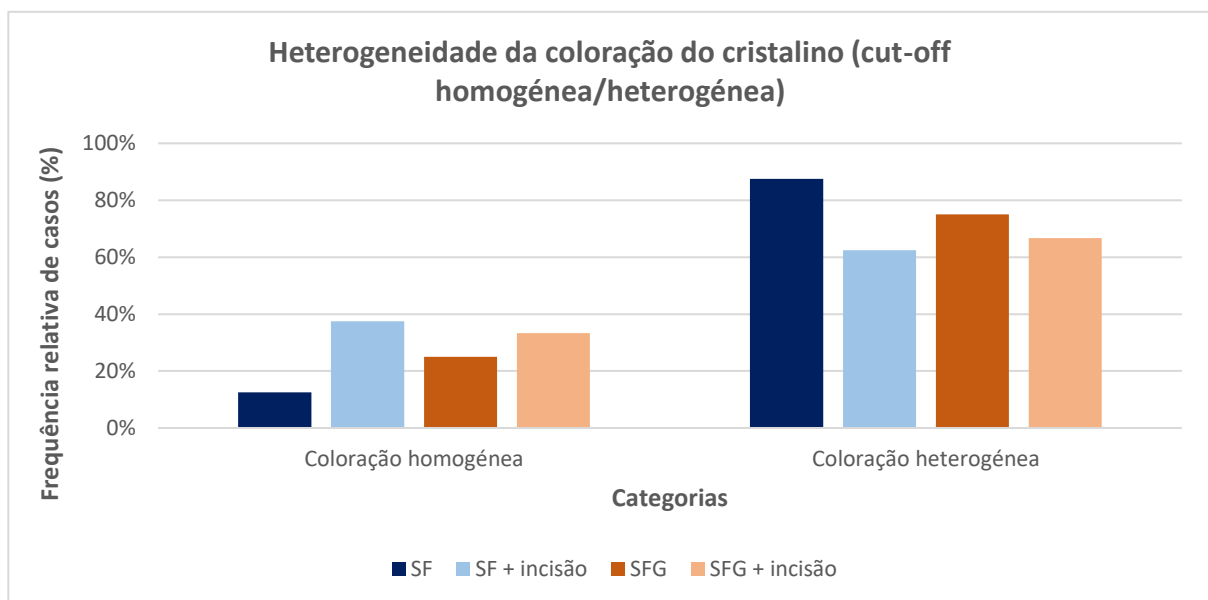


Gráfico 19 – Representação gráfica da distribuição do parâmetro heterogeneidade da coloração em cada um dos grupos, utilizando o *cut-off* de homogénea/heterogénea, sendo SF – Formaldeído a 4% e SFG – Solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

Nas fotografias apresentadas de seguida podemos observar os artefactos descritos na literatura, presentes nos nossos resultados.

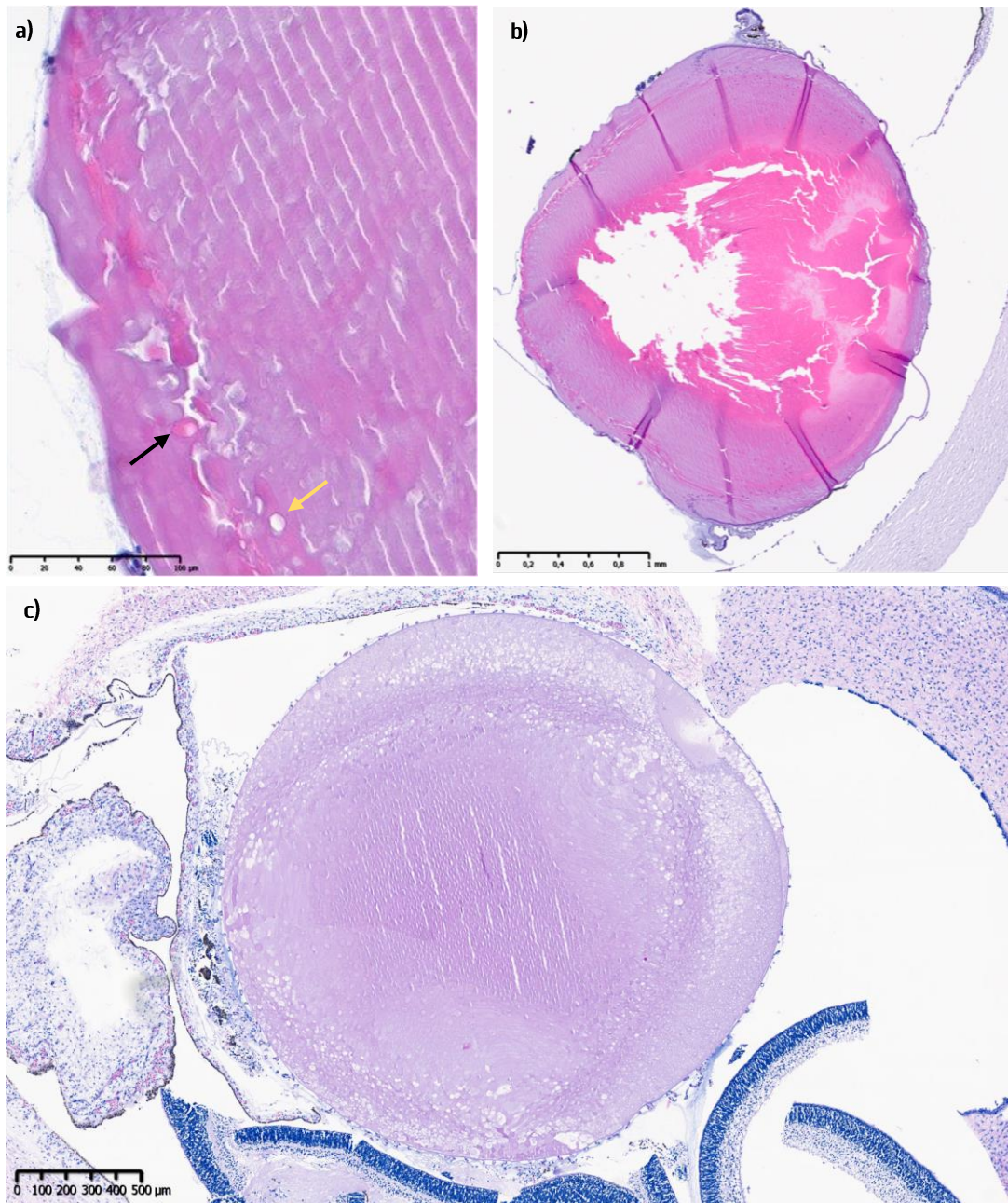


Figura 17 - Imagens histológicas de artefactos visualizados no cristalino dos globos oculares utilizados neste projeto. a) Imagem histológica do cristalino do olho direito do caso número 1 (feto com 24 semanas de idade gestacional), na qual se observa a presença de glóbulos (seta preta) e vacúolos (seta amarela). b) Imagem histológica do cristalino do olho direito do caso número 1 (feto com 24 semanas de idade gestacional), na qual se pode observar a alteração da forma, heterogeneidade da coloração e presença de fendas. c) Imagem histológica do cristalino do olho direito do caso número 14 (feto com 14 semanas de idade gestacional), na qual se pode observar separação capsular anterior/posterior e fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino.

4. Discussão

O estudo de autópsias fetais inclui a avaliação ocular, nomeadamente do cristalino. As características tecidulares do cristalino condicionam à extensão dos efeitos de retração induzidos pela fixação e à consequente formação de artefactos, que mimetizam as cataratas congénitas.

Herwig et al. referiram a importância de conjugar os achados histológicos com os achados macroscópicos, especialmente do exame de transiluminação, para uma interpretação diagnóstica adequada, devido à elevada frequência de artefactos associados à fixação e autólise que identificou (25).

Nos casos do nosso estudo, os cristalinos observados revelaram-se transparentes, não se tendo identificado sombras ou opacidades à observação macroscópica, nomeadamente à transiluminação, permitindo-nos considerar que os achados histológicos observados são secundários ao processo de fixação. O recurso exclusivo a casos de IMG terá permitido reduzir o impacto do fator autólise/ maceração na indução de artefactos, visto que o tempo que decorre entre a morte fetal e a expulsão é mais curta (com colocação imediata do feto em formol), não tendo excedido as 12h nos nossos casos.

Herwig et al. referiram que o cristalino dos olhos fixados com solução de *Karnovsky* adquiria uma coloração amarelada à observação macroscópica, enquanto o cristalino dos olhos fixados em formaldeído apresentava, na sua grande maioria, coloração esbranquiçada (25). Este tipo de alteração não foi identificado nos cristalinos dos olhos deste trabalho, não tendo sido notória uma coloração amarelada do cristalino em nenhum dos casos dos diferentes grupos. A única alteração macroscópica encontrada nos globos oculares deste projeto, foi o facto dos olhos fixados com solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% apresentarem um maior endurecimento da esclerótica, comparativamente aos olhos fixados em formaldeído a 4%, com o mesmo tempo de fixação. Este endurecimento demonstrou ser benéfico aquando da realização da técnica de incisão na esclerótica, conferindo maior suporte para a realização das incisões, e durante a hemissecção do olho. Verificou-se, contudo, maior dificuldade em prevenir o deslocamento do cristalino, aquando da realização da hemissecção, nos casos submetidos à técnica de incisão, mesmo poupando a região central da pupila. Esta dificuldade estava agravada nos casos de fetos com idade gestacional mais baixa, pelas reduzidas dimensões do globo ocular. Contudo, foi notória uma progressiva melhoria de execução técnica à medida que este trabalho

progrediu, sendo esta técnica de incisão adaptável a todas as idades gestacionais estudadas, o que sugere ser importante a participação de um interveniente treinado na sua execução.

Em termos globais a presença de artefactos do cristalino esteve presente em todos os grupos, não se demonstrando específica de fixador, tal como *Herwig et al.* referiu (25). Revelou-se, contudo, menos expressiva nos casos fixados com solução formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% e/ ou com realização de técnica de incisão na esclerótica.

Detalhando os artefactos observados, verificou-se uma diminuição de casos com glóbulos nos grupos em que os olhos foram fixados pela solução em estudo, tendo sido mais frequentes nos olhos fixados em formaldeído a 4% sem a técnica de incisão. Estas observações vão de encontro aos resultados obtidos por *Herwig et al.*, de que os glóbulos estavam presentes com maior frequência nos cristalinos fixados em formaldeído em relação à solução de *Karnovsky* (25). Neste caso, a técnica de incisão não demonstrou ser benéfica para a redução deste artefacto. Os resultados obtidos sugerem que a fixação com a solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% obteve resultados ligeiramente melhores na redução de glóbulos no cristalino, apesar de não se ter identificado significado estatístico.

Foram identificadas fendas no cristalino de todos os casos observados. Os olhos fixados na solução em estudo associada à técnica de incisão na esclerótica apresentaram menor percentagem de casos nas categorias mais elevadas, pelo que, a solução em estudo juntamente com o procedimento adicional de técnica de incisão na esclerótica, parece demonstrar diminuição deste artefacto, apesar de também não se ter identificado relação estatisticamente significativa. Contudo, tal como referido por *Herwig et al.*, a presença de fendas também pode ser considerada um artefacto de corte, corroborado também por *Cogan*, uma vez que o cristalino contém uma elevada concentração de proteínas que condiciona não só o processo de fixação mas também de inclusão e corte (25,42).

Verificou-se a presença de separação capsular anterior/ posterior em todos os casos, exceto no grupo em que os olhos foram fixados em formaldeído a 4% em associação com a técnica de incisão, em que esta separação decorreu em 75,0% dos casos. Observou-se também que, nos grupos em que foi efetuada a incisão na esclerótica, a percentagem de casos nas categorias mais baixas foi maior, em relação aos grupos sem incisão, pelo que, neste tipo de artefacto, esta técnica parece ter contribuído para a sua diminuição. A solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%, neste caso, não demonstrou ser vantajosa, o que vai de encontro com os resultados obtidos por *Herwig et al.*, relativamente à solução de *Karnovsky* (25).

O material proteináceo subcapsular estava ausente em 90,0% dos olhos, sendo que em nenhum dos casos nos quais foi utilizada a solução em estudo como fixador se verificou a deposição de material subcapsular. De entre os olhos fixados em formaldeído a 4%, a percentagem de ausência deste artefacto foi maior nos olhos com técnica de incisão associada. Como tal, o uso da solução em estudo parece ajudar na diminuição/ eliminação deste tipo de artefacto, assim como a técnica de incisão na esclerótica.

A fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino esteve presente em 90,0% dos casos. Este artefacto estava presente em todos os olhos nos quais não foi realizada a técnica de incisão na esclerótica. Foi nos olhos fixados com a solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% que se observou menor frequência deste artefacto. Logo, a técnica de incisão e a fixação com a solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25% aparentam ter contribuído para a redução/ eliminação este tipo de artefactos, embora também não se tenha verificado relação estatisticamente significativa.

Relativamente às alterações da configuração, foi no grupo fixado com a solução em estudo em associação com a técnica de incisão na esclerótica que se identificaram mais casos sem alterações da forma ou com alterações ligeiras, em comparação com os restantes grupos. A técnica de incisão na esclerótica aparenta ter contribuído para a manutenção da forma do cristalino, especialmente ao utilizar como fixador a solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%.

Foram identificadas alterações da coloração do cristalino em todos os grupos, tendo sido nos casos em que não foi efetuada a técnica de incisão na esclerótica que se obteve uma maior percentagem de casos com heterogeneidade de coloração (categorias elevadas). Contudo, nos olhos fixados na solução em estudo, associada à técnica de incisão, apenas se observaram alterações ligeiras na coloração. Desta forma, a técnica de incisão na esclerótica aparenta ter condicionado diminuição da heterogeneidade da coloração do cristalino, especialmente ao utilizar como fixador a solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%. Tal como referido previamente, os nossos resultados, embora sugiram a redução de artefactos com a solução formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%, na maior parte dos casos em combinação com a técnica de incisão na esclerótica, não identificaram diferenças com significado estatístico entre os diferentes grupos. Uma das razões poderá ser o facto de os fetos resultantes de IMG serem enviados em recipientes já contendo o fixador formaldeído a 4%, podendo este período de fixação condicionar já ao desenvolvimento de artefactos, mesmo nos casos em que

posteriormente foi realizada fixação com solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%, após o processo de enucleação. Uma forma de contornar este possível fator será a modificação do procedimento de envio de fetos por parte do serviço de Obstetrícia para o Serviço de Anatomia Patológica do CHUSJ, passando o envio destes fetos a ser efetuado a fresco, mesmo em casos de IMG. Os globos oculares são constituídos por várias camadas com diferentes características, o que, conseqüentemente, se traduz em diferentes níveis de distorção e redução do volume induzidos pelo processo de fixação, demonstrando que a fixação não ocorre de forma uniforme. Este problema de falta de uniformização no processo de fixação é mais evidente no cristalino, em que ocorre uma fixação mais rápida e extensa na superfície relativamente à zona central, devido à densidade elevada de proteínas, forma esférica e à ausência de vasos, tornando este tema um desafio no que toca à otimização do processo de fixação (49–51), tendo-se demonstrado difícil a diminuição ou eliminação de artefactos associados. Os escassos estudos relacionados com este tema dificultam a realização de estudos comparativos.

5. Conclusão

Este estudo demonstrou que os artefatos observados no cristalino, que mimetizam as alterações histológicas identificadas em casos de cataratas congénitas, não são específicos de um determinado fixador. Os resultados indicaram que a fixação com a solução de formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%, em associação com a técnica de incisão na esclerótica, mostra uma tendência para a redução da generalidade destes artefatos, embora não tenha sido identificada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos da amostra analisada. A técnica de incisão na esclerótica mostrou benefícios na redução de alguns artefatos, como glóbulos, separação capsular anterior/posterior e fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino. No entanto, esta técnica também apresentou desafios a nível técnico, especialmente nos fetos com menor idade gestacional, sendo importante a aquisição de experiência para a sua concretização. A presença de fendas no cristalino também foi observada, podendo esta presença ter, neste caso, uma origem mista, com contributo da técnica de corte.

A fixação com a solução em estudo em associação com a técnica de incisão na esclerótica parece também contribuir para a redução de artefatos, como a deposição de material proteináceo subcapsular, alterações da forma e heterogeneidade da coloração do cristalino. No entanto, a redução destas alterações não teve significado estatístico neste trabalho.

Este estudo evidenciou uma tendência para a redução dos artefactos do cristalino secundários ao processo de fixação com recurso a uma solução fixadora (formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%), por vezes associada à técnica de incisão na esclerótica. A dificuldade de uniformização do processo de fixação do cristalino, devido à sua complexidade estrutural, é um problema que pode levar a dificuldades de diagnóstico de processos patológicos do cristalino, nomeadamente de cataratas congénitas. A escassez de estudos comparativos nesta área dificulta a otimização do processo de fixação e a compreensão dos artefatos observados. Este estudo acrescenta novos dados relativamente ao resultado histológico do cristalino, cuja fixação é realizada com recurso à solução em estudo e à técnica de incisão, sendo importante a correlação com os aspetos macroscópicos observados, nomeadamente, da transiluminação, para um diagnóstico adequado. Mais estudos serão necessários, no sentido de otimizar o processo de fixação do cristalino, mais especificamente em casos de autópsia fetal.

5.1. Perspetivas futuras

Como perspetivas futuras, apresenta-se necessário o alargamento da amostra em estudo, de forma a melhor compreender a tendência verificada no nosso estudo, com uma amostra robusta numericamente. O envio dos fetos a fresco para o serviço de Anatomia Patológica também será uma alteração que poderá melhorar na redução dos artefactos, não se expondo à fixação inicial exclusiva com formaldeído, sendo, portanto, um ajuste futuro que se tentará realizar com a colaboração dos serviços envolvidos (serviço de Anatomia Patológica e serviço de Obstetrícia do CHUSJ). A avaliação da antigenicidade dos tecidos nos diferentes grupos, com recurso a estudo imunohistoquímico, será também um ponto a esclarecer no futuro, no sentido de perceber se a utilização da solução fixadora (formaldeído a 1% e glutaraldeído a 1,25%) e a técnica de incisão na esclerótica não afetam a antigenicidade dos tecidos do olho.

Referências Bibliográficas

1. Herwig MC, Müller AM, Holz FG, Loeffler KU. Morphologic analysis of artifacts in human fetal eyes confounding histopathologic investigations. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(5).
2. Verdijk RM, Herwig-Carl MC. *Fetal and Neonatal Pathology*. Springer; 2020.
3. Remington LA. Visual System. In: *Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System*. 2012. p. 1–9.
4. Khurana A, Khurana AK, Khurana BP. Anatomy and Development of Eye. In: *Comprehensive Ophthalmology*. 7th ed. Jaypee Brothers Medical Publishers; 2019. p. 3–13.
5. Netter FH. Head and Neck. In: *Atlas of Human Anatomy*. 7th ed. Elsevier; 2019.
6. R.Galloway N, M.K.Amoakuholas W, H.Galloway P, C.Browning A. Basic Anatomy and Physiology of the Eye. In: *Transactions – American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology*. 3rd ed. Springer; 2006.
7. Junqueira LC, Carneiro J, Abrahamsohn P. Sistemas Fotorreceptor e Audiorreceptor. In: *Histologia Básica*. 13th ed. Guanabara Koogan; 2017.
8. Douglas RH, Lawrenson JG. Eye. In: *Standring S, editor. Gray's Anatomy The Anatomical Basics of Clinical Practice*. 41st ed. Elsevier; 2016.
9. Prause JU, Saornil MAn. Eye Pathology: An Illustrated Guide. Heegaard S, Grossniklaus H, editors. Springer; 2015.
10. Klintworth G k., Cummings TJ. Normal Eye and Ocular Adnexa. In: *Mills SE, editor. Histology for Pathologists*. 4th ed. Wolters Kluwer; 2012. p. 375–98.
11. Maia NC de F. Fundamentos básicos da oftalmologia e suas aplicações. EDUFT; 2018. 122 p.
12. Lopes AB, Vilefort LA, Gonçalves ACL, Leste RGM, Junqueira LMB, Bueno N de S, et al. Aspectos gerais sobre catarata: uma revisão narrativa. *Rev Eletrônica Acervo Saúde*. 2021;13(9).
13. Sowden JC. Development of the eye. In: *Standring S, editor. Gray's Anatomy The Anatomical Basics of Clinical Practice*. 41st ed. Elsevier; 2016. p. 661–5.
14. Graw J. Eye Development. In: *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier Inc.; 2010. p. 343–86.
15. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Desenvolvimento dos Olhos e das Orelhas. In:

- Embriologia Básica. 9th ed. Elsevier; 2016. p. 371–86.
16. Sadler TW. Eye. In: Langman's Medical Embryology. 12th ed. Wolters Kluwer; 2012. p. 329–44.
 17. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Desenvolvimento dos olhos. In: Larsen Embriologia Humana [Internet]. 5th ed. Elsevier; 2016. Available from: http://www.academia.edu/download/62568352/Larsen_portugues_Embriologia_Humana_-_5ª_Ed-1-compactado20200330-84563-1hh5maa.pdf
 18. Delgado ES da C. Estudo da regulação da circulação ocular num modelo de olho isolado de coelho. Universidade Técnica de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária; 2008.
 19. De Haan A, Willekens B, Klooster J, Los A, Van Zwieten J, Botha C, et al. The prenatal development of the human orbit. *Strabismus*. 2006;14(1):51–6.
 20. Mansoor N, Mansoor T, Ahmed M. Eye pathologies in neonates. *Int J Ophthalmol*. 2016;9(12):1832–8.
 21. Fei P, Liu Z, He L, Li N, Xu L, Zhang M, et al. Early detection of ocular abnormalities in a Chinese multicentre neonatal eye screening programme—1-year result. *Acta Ophthalmol*. 2021;99(3):e415–22.
 22. Aksay S, Bildirici İ, Coşar CB, Alanay Y, Ciğercioğulları E. Intrauterine cataract diagnosis and follow-up. *Turkish J Ophthalmol*. 2020;50(4):245–7.
 23. Salmon JF. *KANSKI'S Clinical Ophthalmology A Systematic Approach*. 9th ed. British Journal of Ophthalmology. Elsevier; 2020.
 24. Levin A V. Congenital eye anomalies. *Pediatr Clin North Am*. 2003;50(1):55–76.
 25. Herwig MC, Müller AM, Klarmann-Schulz U, Holz FG, Loeffler KU. Lens artifacts in human fetal eyes – The challenge of interpreting the histomorphology of human fetal lenses. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2014;252(1).
 26. Connolly AJ, Finkbeiner WE, Ursell PC, Davis RL. Special Dissection Procedures. In: *Autopsy Pathology: A Manual and Atlas*. 2016. p. 66–79.
 27. Centro Hospitalar São João. *Manual de Macroscopia do Serviço de Anatomia Patológica*. 2013.
 28. Pang J, Thomas N, Tsuchiya D, Parmely T, Yan D, Xie T, et al. Step-by-step preparation of mouse eye sections for routine histology, immunofluorescence, and RNA in situ hybridization multiplexing. *STAR Protoc* [Internet]. 2021;2(4):100879. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100879>

29. Layton C, Bancroft JD, Suvarna K. Fixation of tissues. In: Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 8th ed. Elsevier; 2019.
30. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
31. Molinaro E, Caputo L, Amendoeira R. Conceitos e Métodos para a Formação de Técnicos em Laboratórios de Saúde [Internet]. Conceitos e Métodos para a Formação de Técnicos em Laboratórios de Saúde. 2010. Available from: [http://www.fiocruz.br/ioc/media/vol_2\[1\].pdf](http://www.fiocruz.br/ioc/media/vol_2[1].pdf)
32. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods. 4th ed. 2008.
33. Kiernan JA. Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde And Glutaraldehyde: What They Are And What They Do. *Micros Today*. 2000;8(1):8–13.
34. Chang R, Goldsby KA. Química. 11th ed. AMGH Editora Ltda.; 2013.
35. Yanoff M, Zimmerman LE, Fine BS. Glutaraldehyde Fixation of Whole Eyes. *Am J Clin Pathol*. 1965;44(2):167–71.
36. Yanoff M, Fine BS. Glutaraldehyde fixation of routine surgical eye tissue. *Am J Ophthalmol*. 1967;63(1):137–40.
37. Nowacek JM. Fixation and Tissue Processing. In: Kumar G I, editor. Education Guide Special Stains and H & E. Dako; 2010. p. 141–52.
38. Barash BA, Shepard TH. Quantitative assessment of effects on fetal rat eyes of fixative and of time postmortem at fixation. *Teratology*. 1976;13(3):267–73.
39. Herwig-Carl MC, Loeffler KU, Müller AM. Bedeutung der Untersuchung fetaler Augen: Ergänzung der Fetobduktion. *Pathologe*. 2017;38(4):231–40.
40. Dubucs C, Chassaing N, Khung-Savatovsky S, Aziza J, Courtade-Saïdi M. Artifacts and main lesions in fetal ocular histology. *Morphologie*. 2022;107:207–18.
41. Nunes C de S, Cinsa LA. Princípios do Processamento Histológico de Retina. *Rev Interdiscip Estud Exp*. 2016;8:31–40.
42. Cogan DG. Anatomy of Lens and Pathology of Cataracts. 1962;291–5.
43. Kuszak JR, Zoltoski RK, Tiedemann CE. Development of lens sutures. *Int J Dev Biol*. 2004;48(8–9):889–902.
44. Gozzo FV. Caracterização Morfológica de tecidos oculares por Microscopia de Força Atômica (MFA). 2009.
45. Margo CE, Lee A. Fixation of whole eyes: the role of fixative osmolarity in the production of

- tissue artifact. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1995;233(6):366–70.
46. Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16(3):400–5.
 47. Nassar K, Lüke J, Lüke M, Kamal M, Soliman MM, Grisanti S, et al. Effect of different fixative solutions on eyes with experimental proliferative vitreoretinopathy. *Int J Exp Pathol.* 2015;96(2):103–10.
 48. Lopes C, Malhão F, Rocha E. *Curso de Técnicas Histológicas.* 2016; Available from: http://biomarpt.ipma.pt/pdfs/6653CURS05_Guia_tecnico.pdf
 49. Sun N, Shibata B, Hess JF, Fitzgerald PG. An alternative means of retaining ocular structure and improving immunoreactivity for light microscopy studies. *Mol Vis.* 2015;21(April):428–42.
 50. Grahn B, Peiffer R, Wilcock B. – Fixation and processing of ocular tissues. In: *Histologic Basis of Ocular Disease in Animals.* 1st ed. John Wiley & Sons; 2019. p. 1–14.
 51. Radzuan HM, Saharudin S, Omar WFNW, Rahim NEHA, Halim MD. The effect of prolonged fixation time on haematoxylin & eosin staining quality of rats colon and placenta tissue. *IUM J Orofac Heal Sci* 2022. 2022;3(1).

Anexo I

Protocolo de Macroscopia de peças de enucleação do globo ocular CHUSJ

14.3. Enucleação do Globo Ocular

Procedimento

A. Fixar o globo ocular intacto durante 24 horas; não é aconselhável abrir o globo, abrir janelas na esclera, nem injetar fixador no vítreo.

B. Lavar com água da torneira pelo menos 1 hora e, em opção, colocar o globo ocular em Etanol a 60% durante algumas horas adicionais.

C. Procurar rever o sumário da história clínica e, eventualmente, resultados do exame oftalmológico antes de iniciar o exame macroscópico.

D. Descrever a dimensão ântero-posterior, horizontal, e vertical do globo, comprimento do nervo ótico e dois diâmetros ortogonais da córnea (Figura 65).

E. Procurar e descrever locais de traumatismo acidental ou cirúrgico.

F. Se possível, transluminar o globo antes de o seccionar. Pode usar a lâmpada da parte inferior de um microscópico colocando o globo sobre o vidro em sala escura; rodar o globo sobre a fonte de luz; quando se detetam sombras anormais, marcá-las na esclera com marcador.

G. Examinar o globo com uma objetiva na lupa de dissecação para identificar pequenas lesões.

H. Fotografar o globo ocular.

I. Se houver suspeita de corpo estranho intraocular ou retinoblastoma, radiografar o globo antes de o seccionar.

J. Se existir suspeita de melanoma maligno colher, pelo menos, um fragmento de uma veia vorticosa de cada um dos quatro quadrantes (Figura 66).

K. Abrir o globo com uma lâmina de micrótomo, nova, segurando o globo com a mão esquerda entre o polegar e o dedo médio e a córnea em posição inferior, apoiada na tábua de dissecação; o corte é realizado com a mão direita, que segura a lâmina e, com um movimento único, de trás para a frente. O plano do corte deve começar adjacente ao nervo ótico e terminar na periferia da córnea (Figura 67). O plano de corte é dependente da identificação, ou não, da lesão após transluminação:

Anexo II

Protocolo de Macroscopia de peças de enucleação do globo ocular CHUSJ (continuação)

a. No caso de não se ter identificado lesão, cortar o globo segundo um plano horizontal, usando como marcas as inserções dos músculos oblíquos superior e inferior e a veia pós ciliar longa.

b. No caso de se ter identificado lesão, modificar o plano de corte por forma a incluir a lesão no disco que se pretende obter (Figura 68).

L. Examinar o interior do globo e fotografar.

M. Descrever qualquer lesão encontrada.

N. Colocar as superfícies de corte de ambas as calotes sobre a tábua de dissecação e realizar um segundo plano de corte, em cada uma, paralelo ao inicial e de trás para a frente.

O. Examinar cuidadosamente o fragmento obtido, em forma de disco, devendo este incluir córnea, pupila, cristalino e nervo ótico (Figura 65).

Descrição

1. GLOBO OCULAR:

1.1. Lateralidade do globo.

1.2. Dimensão ântero-posterior, horizontal e vertical do globo ocular.

1.3. Comprimento do nervo ótico.

1.4. Dimensão horizontal e vertical da córnea.

1.5. Descrever segmento anterior: incisões cirúrgicas, opacificação da córnea, anomalias da íris.

1.6. Descrever presença/ausência do cristalino.

1.7. Descrever achados da transiluminação.

2. DISCO DO GLOBO OCULAR:

2.1. Espessura da córnea.

2.2. Profundidade e configuração da câmara anterior.

2.3. Aspeto da íris, corpo ciliar e cristalino.

2.4. Aspeto da coróide, retina, câmara vítrea e disco ótico.

Anexo III

Protocolo de Macroscopia de peças de enucleação do globo ocular CHUSJ (continuação)

2.5. No caso de tumor descrever:

2.5.1. Localização e três dimensões (dimensão da base de implantação e da espessura).

2.5.2. Cor, limites, consistência, presença de hemorragia ou necrose.

2.5.3. Estruturas oculares envolvidas e extensão para o nervo ótico.

Exemplo de descrição macroscópica

Exame nº _____, de _____ (nome utente).

Peça de enucleação direita/esquerda, recebida a fresco/em formol, referenciada/não referenciada, compreendendo globo ocular com ___cm (ântero-posterior), ___cm (horizontal), e ___cm (vertical), nervo ótico com ___cm de comprimento, e córnea com ___x___cm. Observa-se ainda _____ (incisões cirúrgicas, opacificação da córnea, anomalias da íris, presença de cristalino, achados da transluminação). Ao corte, a córnea tem ___cm de espessura e a câmara anterior ___cm de profundidade. Observa-se ainda lesão localizada na/o _____, com ___cm na base de implantação e ___cm de espessura, de cor _____, consistência _____ e limites _____. A lesão estende-se a _____ (estruturas envolvidas, incluindo nervo ótico).

Fragmentos para Histologia

Cassete #1 a 4: Inclusão total do globo ocular

Cassete #5: Nos tumores, especialmente em retinoblastomas, inclusão de um fragmento transversal da margem cirúrgica do nervo ótico.

Cassete #6: Em melanoma maligno inclusão de pelo menos um fragmento de cada veia vorticosa de cada um dos 4 quadrantes.

Anexo IV

Documento de aprovação da Comissão de ética do CHUSJ

<p>Centro de Epidemiologia Hospitalar</p> <p>Tornel cobredimento, Nada a copor. A DC.</p> <p>24 de Outubro de 2022</p> <p>A Direção do Centro de Epidemiologia Hospitalar</p> <p><i>[Signature]</i></p> <p>(Prof.ª Doutora Ana Azevedo)</p>	<p>DIRECÇÃO CLÍNICA</p> <p>25 OUT. 2022</p> <p><i>[Logo]</i></p> <p>SÃO JOÃO</p> <p>n.º 263 / 22</p>
<p>PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO</p> <p>Realização de Investigação</p>	
<p>Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Administração do Centro Hospitalar de São João</p> <p><i>[Stamp: CONSELHO DE ADMINISTRAÇÃO - REUNÃO DE Presidente do Conselho de Administração]</i></p>	
<p>Nome do Investigador Principal:</p> <p>Ana Costa Braga</p> <p>Título da Investigação:</p> <p>Avaliação de artefactos de fixação do cristalino em olhos fetais</p>	
<p>Pretendendo realizar no(s) Serviço(s) de:</p> <p>Anatomia Patológica</p> <p>a investigação em epigrafe, solicito a V. Exa., na qualidade de Investigador/Promotor, autorização para a sua efetivação.</p> <p>Para o efeito, anexo toda a documentação referida no dossier da Comissão de Ética do Centro Hospitalar de São João/Faculdade de Medicina da Universidade do Porto respeitante à investigação, à qual enderecei pedido de apreciação e parecer.</p>	
<p>Com os melhores cumprimentos,</p> <p>O Investigador/Promotor</p> <p>Porto, 30 de setembro de 2022</p> <p><i>[Signature]</i></p>	
<p>«Centro Hospitalar São João» Centro de Epidemiologia Hospitalar</p> <p>18.10.22</p> <p><i>[Signature]</i></p>	

Anexo V

Folha de registo macroscópico (Frente)

FOLHA DE REGISTO

PROJETO: *Avaliação de artefactos de fixação do cristalino em olhos fetais.*

#COF: _____ **#SAP CHUSJ:** _____

Informação Clínica: _____

Idade gestacional: _____ ; **Tempo de retenção:** _____

Fotografias: Sim Não

Olho Esquerdo (submetido a técnica de incisão na esclerótica)

Transiluminação:

Pré-fixação: sem alterações
 com alterações

Pós-fixação: sem alterações
 com alterações

Dimensões do olho:

Diâmetro ântero-posterior: _____ mm

Diâmetro horizontal: _____ mm

Diâmetro vertical: _____ mm

Comprimento do nervo ótico: _____ mm

Dimensões da córnea:

Diâmetro vertical: _____ mm

Diâmetro horizontal: _____ mm

Descrição macroscópica:

Segmento anterior:

Córnea: _____

Íris: _____

Cristalino: _____

Segmento posterior

Fixador utilizado:

- Formaldeído 4%
 Solução (Formaldeído a 1% e Glutaraldeído a 1,25%)

Olho Direito (técnica padrão de imersão)

Transiluminação:

Pré-fixação: sem alterações
 com alterações

Pós-fixação: sem alterações
 com alterações

Dimensões do olho:

Diâmetro ântero-posterior: _____ mm

Diâmetro horizontal: _____ mm

Diâmetro vertical: _____ mm

Comprimento do nervo ótico: _____ mm

Dimensões da córnea:

Diâmetro vertical: _____ mm

Diâmetro horizontal: _____ mm

Descrição macroscópica:

Segmento anterior:

Córnea: _____

Íris: _____

Cristalino: _____

Segmento posterior

Fixador utilizado:

- Formaldeído 4%
 Solução (Formaldeído a 1% e Glutaraldeído a 1,25%)

Responsáveis pelo Registo: _____

Anexo VI

Folha de registo macroscópico (Verso)

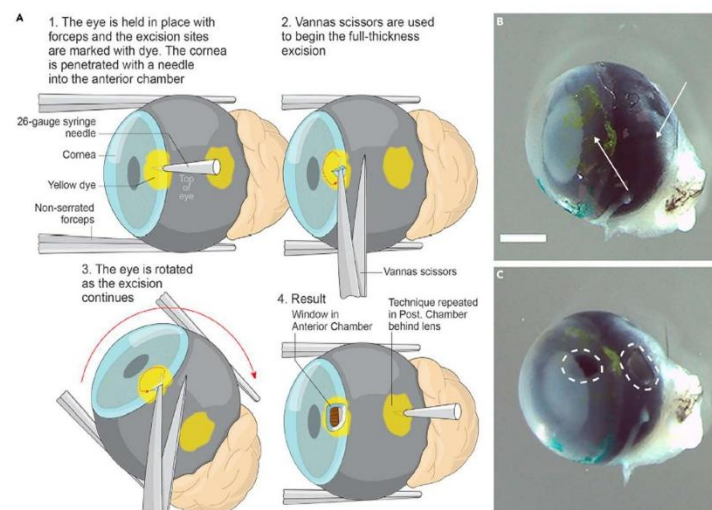


Figure 1. Window technique

(A) An illustration demonstrating how windows are created on the eye wall (A). This operation applies to all three windows although the sample illustration is made on the anterior wall.

(B) is eye sample before applying the window technique. White arrow points to the region for the 2 windows.

(C) is the eye sample after making windows on an eyeball. Dashed white polygons highlight the 2 windows. The third window is not shown. Scale bar: 1000 μ m.

Fonte: Pang J, Thomas N, Tsuchiya D, Parmely T, Yan D, Xie T, et al. Step-by-step preparation of mouse eye sections for routine histology, immunofluorescence, and RNA in situ hybridization multiplexing. STAR Protoc [Internet]. 2021;2(4):100879. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100879>

Figura 1.- Esquema de técnica de incisão.

Anexo VII

Protocolo do processamento histológico no Serviço de Anatomia Patológica do CHUSJ

1. Formol (30 minutos)
2. Formol (30 minutos)
3. Etanol (45 minutos)
4. Etanol (45 minutos)
5. Etanol (1 hora)
6. Etanol (1 hora)
7. Etanol (1 hora e 15 minutos)
8. Xilol (1 hora)
9. Xilol (1 hora)
10. Xilol (1 hora e 15 minutos)
11. Parafina (1 hora)
12. Parafina (1 hora)
13. Parafina (1 hora)
14. Parafina (1 hora)

Anexo VIII

Protocolo da coloração de Hematoxilina-Eosina no Serviço de Anatomia Patológica do CHUSJ

1. Estufa (15 minutos)
2. Xilol (2 minutos)
3. Xilol (3 minutos)
4. Etanol a 100% (1 minutos)
5. Etanol a 100% (1 minutos)
6. Etanol a 95% (1 minutos)
7. Etanol a 70% (1 minutos)
8. Lavagem (1 minutos e 30 segundos)
9. Hematoxilina de Gill II (Leica Biosystems, Richmond) (5 minutos)
10. Lavagem (1 minuto)
11. Água amoniacal (15 segundos)
12. Lavagem (1 minuto)
13. Etanol a 95% (30 segundos)
14. Eosina G ou Y alcoólica 0,5% (DiaPath S.p.A., Martinengo) (2 minutos e 30 segundos)
15. Etanol a 95% (1 minuto)
16. Etanol a 100% (30 segundos)
17. Etanol a 100% (30 segundos)
18. Etanol a 100% (1 minuto)
19. Xilol (1 minuto)
20. Xilol (2 minutos)

Anexo IX

Folha de registo microscópico

FOLHA DE REGISTO MICROSCÓPICO

PROJETO: *Avaliação de artefactos de fixação do cristalino em olhos fetais.*

#COF: _____ **#SAP CHUSJ:** _____

Informação Clínica: _____

Idade gestacional: _____ **Tempo de retenção:** _____

Fotografias: Sim Não

Olho Esquerdo (submetido a técnica de incisão na esclerótica)

Fixador utilizado:

- Formaldeído 4%
 Solução (Formaldeído a 1% e Glutaraldeído a 1,25%)

Avaliação Microscópica (presença e intensidade)

Glóbulos: 0% 1-5% 6-25% 26-50% 51-75% 76-99% 100% Localização: _____

Vacíolos: 0% 1-5% 6-25% 26-50% 51-75% 76-99% 100% Localização: _____

Fendas: 0% 1-5% 6-25% 26-50% 51-75% 76-99% 100%

Separação capsular anterior/posterior: 0% 1-5% 6-25% 26-50% 51-75% 76-99% 100%

Material proteico subcapsular: 0% 1-5% 6-25% 26-50% 51-75% 76-99% 100%

Fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino: 0% 1-5% 6-25% 26-50% 51-75% 76-99% 100%

Forma: redonda ligeiramente irregular moderadamente irregular irregular

Coloração: homogénea ligeiramente heterogénea moderadamente heterogénea heterogénea

Outras alterações: _____

Olho Direito (técnica padrão de imersão)

Fixador utilizado:

- Formaldeído 4%
 Solução (Formaldeído a 1% e Glutaraldeído a 1,25%)

Avaliação Microscópica (presença e intensidade)

Glóbulos: 0% 1-5% 6-25% 26-50% 51-75% 76-99% 100% Localização: _____

Vacíolos: 0% 1-5% 6-25% 26-50% 51-75% 76-99% 100% Localização: _____

Fendas: 0% 1-5% 6-25% 26-50% 51-75% 76-99% 100%

Separação capsular anterior/posterior: 0% 1-5% 6-25% 26-50% 51-75% 76-99% 100%

Material proteico subcapsular: 0% 1-5% 6-25% 26-50% 51-75% 76-99% 100%

Fragmentação da cápsula e epitélio do cristalino: 0% 1-5% 6-25% 26-50% 51-75% 76-99% 100%

Forma: redonda ligeiramente irregular moderadamente irregular irregular

Coloração: homogénea ligeiramente heterogénea moderadamente heterogénea heterogénea

Outras alterações: _____

Responsáveis: _____