MICHELLE BARBOSA PEREIRA BRAGA

Determinação dos elementos químicos em lentes com catarata diabética e propriedades biomecânicas da cápsula da lente, na espécie canina

São Paulo
2010

MICHELLE BARBOSA PEREIRA BRAGA

Determinação dos elementos químicos em lentes com catarata diabética e propriedades biomecânicas da cápsula da lente, na espécie canina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Profa. Dra. Andrea Antunes Pereira

São Paulo
2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
2/12/10

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2382
FMVZ

Braga, Michelle Barbosa Pereira
Determinação dos elementos químicos em lentes com catarata diabética e propriedades biomecânicas da cápsula da lente, na espécie canina / Michelle Barbosa Pereira Braga. -- 2010.
98 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Antunes Pereira.

1. Elementos traço. 2. Diabetes Mellitus. 3. Catarata. 4. Fluorescência de raios X. 5. Mapas de distribuição composicional. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado: "Propriedades elásticas dos tecidos oculares", protocolado sob o nº1705/2009, utilizando 50 (cinquenta) cães, sob a responsabilidade do Profa. Dra. Andrea Antunes Pereira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 24/03/2010.

We certify that the Research "Elasticity of ocular tissues and morphologic examination", protocol number 1705/2009, utilizing 50 (fifty) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Andrea Antunes Pereira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 03/24/2010.

São Paulo, 25 de março de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BRAGA, Michelle Barbosa Pereira

Título: Determinação dos elementos químicos em lentes com catarata diabética e propriedades biomecânicas da cápsula da lente, na espécie canina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

À minha mãe **Ivanildes,** pelo amor, compreensão, dedicação e incentivo aos meus estudos, a quem devo a minha vida. Ao meu pai **Paulo**, pelos ensinamentos e sacrifícios dedicados a mim.

Ao meu irmão **Paulo**, que me mostrou a importância de viver cada dia como se fosse o último, todo meu amor e imensa saudade.

Ao meu grande amor **Ricardo**, pelo companheirismo, apoio, amizade, dedicação, amor e incentivo a minha carreira, durante todos estes anos.

À **Deus**, por mais uma realização.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Dra. Andrea Antunes** pela oportunidade, ensinamentos e amadurecimento obtidos durante o mestrado, meu muito obrigado.

Ao professor **Dr. Paulo Sérgio de Moraes Barros** por abrir as portas do Serviço de Oftalmologia do Hospital Veterinário/USP, obrigada pela confiança.

Ás minhas colegas de mestrado, **Sonia Elizabete Alves Lima Will** e **Patrícia Christiane de Oliveira Crivelli Jezler**, por toda amizade, colaboração e carinho, e por fazerem parte de uma realização tão importante.

À Médica Veterinária **Cristiane Garcia Lima**, amiga, irmã, companheira, com quem aprendi a ser uma pessoa melhor e me incentivou a seguir sempre em meus objetivos.

Á Médica Veterinária e colega de pós-graduação **Ana Paula Hvenegaard**, obrigado pelo apoio e colaboração desde o início. Aos médicos veterinários e pós-graduandos, **Eduardo Perlmann**, **Daniela de Castro Leandro** e **Luiz Felipe de Moraes Barros** e a médica veterinária **Dra. Angélica de Mendonça Vaz Safatle** pela paciência e toda ajuda.

Aos secretários do Departamento de Anatomia, **Maicon Barbosa** e **Jackeline**, obrigada pela força.

A Professora **Dra. Maria Inês Borella** e aos pós-graduandos **Vanessa**, **Chayra**, **Gisele**, **Matheus**, **Lazáro** pela amizade, disponibilidade e hospitalidade em me receber no Laboratório de Endocrinologia de Peixes do ICB/USP.

A Professora **Maria Luisa Carvalho** do Centro de Física Atômica da Faculdade de Ciências de Lisboa, Portugal. Agradeço por toda experiência.

Ao técnico do ICB/USP, **Cruz**, um profissional e ser humano diferenciado, obrigado pela enorme paciência e ensinamentos.

Ao técnico do Centro de Lasers e Aplicações/IPEN, **Marcos Scapin** pela disposição em nos ajudar sempre.

Ao **Laboratório Nacional de Luz Síncrotron** (LNLS), por abrir as portas para este projeto. E ao pesquisador do LNLS, **Dr. Carlos Pérez** pela paciência e ensinamentos.

E ao **Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia**, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pelas análises no Microscópio de Força Atômica, e pelo especial apoio do **Dr. Marcelo Nakamura** e professor **Dr. Henrique Eisi Toma.**

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES), pela bolsa concedida que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

Á **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP), processo n.° 2005/00698-1, pelo auxílio à pesquisa concedida. Esse auxílio financeiro permitiu que os experimentos vinculados a essa dissertação pudessem ser desenvolvidos

RESUMO

BRAGA, M. B. P. **Determinação dos elementos químicos em lentes com catarata diabética e propriedades biomecânicas da cápsula da lente, na espécie canina**. [Determination of chemical elements in diabetic cataract and biomechanical properties of the lens capsule in dogs]. 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina e Zootecnia, Universidade de São Paulo – São Paulo, 2010.

O diabetes mellitus é umas das principais endocrinopatias da espécie canina. Esta doença é caracterizada pela deficiência relativa ou absoluta de insulina. A formação da catarata é uma complicação freqüente do cão diabético, resultando em cegueira. A lente do paciente diabético está sujeita ao aumento do estresse oxidativo em razão da dificuldade em regular os níveis glicêmicos gerando hiperglicemia crônica. Os elementos químicos estão envolvidos em diversos processos no organismo. Portanto, alterações como deficiência ou excesso dos elementos químicos podem contribuir para as complicações do diabetes mellitus, incluindo a catarata. A cápsula da lente, importante estrutura na cirurgia de catarata, está associada com uma diminuição da espessura, tornando-se mais fina como o avanço da catarata. O objetivo deste estudo foi determinar, por meio do uso da fluorescência de raios X (XRF), a concentração dos elementos químicos cálcio, ferro, cobre e zinco e analisar a topografia dos elementos traços ferro, cobre e zinco. Por meio dos mapas de distribuição determinou-se as regiões de intensa atuação dos elementos constituintes e traços, e seu papel efetivo para a lesão. E por meio da microscopia de força atômica (MFA) determinar as propriedades biomecânicas associadas à catarata em cães. A fluorescência de raios X mostrou-se eficiente para a determinação da concentração elementar de cálcio, ferro, cobre e zinco em cataratas de cães portadores de diabetes mellitus. As análises quantitativas mostraram um aumento na concentração e redução na concentração de ferro e cobre nas lentes de cães diabéticos. Estes resultados concordam com hipóteses discutidas na literatura. A microscopia de força atômica proporcionou medidas elasticidade rápidas e precisas em amostras de cápsula anterior da lente de cães, com mínima preparação da amostra. Os valores de elasticidade local apresentaram-se ligeiramente superiores para lentes diabéticas.

Palavras-chave: Elementos traço. Diabetes Mellitus. Catarata. Fluorescência de raios X. Mapas de distribuição composicional.

ABSTRACT

BRAGA, M. B. P. **Determination of chemical elements in diabetic cataract and biomechanical properties of the lens capsule in dogs**. [Determinação dos elementos químicos em lentes com catarata diabética e propriedades biomecânicas da cápsula da lente, na espécie canina]. 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina e Zootecnia, Universidade de São Paulo – São Paulo, 2010.

Diabetes mellitus is one of the principal endocrinopathies in canine. The disease is characterized by absolute or relative deficiency of insulin. The formation of cataract is frequent complication in diabetic dogs, leading to blindness. The lens of diabetic patient is subjected to increased oxidative stress due to the difficulty in regulating blood glucose levels causing chronic hyperglycemia. The chemical elements are involved in several functions in the organism. Therefore, alterations like deficiency or excess of chemical elements may contribute to the complications of diabetes mellitus including cataract. The lens capsule, an important structure of cataract surgery is associated to a decrease in thickness, becoming thinner with the advance of the cataract. The objective of this work was to determine, through the use of X ray fluorescence (XRF), the concentration of chemical elements such as calcium, iron, cooper and zinc and analyze the topography of the trace elements iron, cooper and zinc. By the means of elementary distribution maps we could determine the regions of the intense action of the constituent elements and trace and its effective role in relation to the lesion. By means of atomic force microcopy (AFM), we could determine the biochemical properties associated to the cataract in dogs. X ray fluorescence showed efficient for the determination of the elementary concentration of calcium, iron, cooper and zinc in cataracts in dogs carrying diabetes mellitus. Quantitative analysis showed an increase in calcium and a reduction in iron and copper concentration in lenses of diabetic animals. These results are in accordance to the hypothesis discussed in the literature. The atomic force microscopy provided measures of rapid and accurate elasticity in samples of anterior capsules of lenses in dogs, with minimum preparation of samples. The values of local elasticity showed slightly superior for diabetic lenses.

Key-words: Trace elements. Diabetes mellitus. Cataract. X ray fluorescence. Elementary distribution maps.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação fotográfica de um cão da raça Poodle com catarata diabética 29

Figura 2- Representação fotográfica do equipamento de fluorescência de raios X por energia de dispersão (EDXRF) utilizado neste estudo 48

Figura 3- Representação fotográfica do arranjo experimental utilizado neste estudo para as medidas por microfluorescência de raios X (µXRF) 50

Figura 4- Apresentação dos locais utilizados para as medidas de elasticidade pela Microscopia de Força Atômica 54

Figura 5- Representação fotográfica do equipamento de microscopia de força atômica (MFA) utilizado neste estudo 55

Figura 6- Mapa bidimensional da concentração de ferro em amostras de lente normal 67

Figura 7- Mapa bidimensional da concentração de ferro em amostras de catarata diabética 68

Figura 8- Mapa bidimensional da concentração de cobre em amostras de lente normal 68

Figura 9- Mapa bidimensional da concentração de cobre em amostras de catarata diabética 69

Figura 10- Mapa bidimensional da concentração de zinco em amostras de lente normal 69

Figura 11- Mapa bidimensional da concentração de zinco em amostras de catarata diabética 70

Figura 12- Representação esquemática do tratamento dos dados para determinação da elasticidade local através da força versus indentação 71

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1- Esquema de preparação das amostras para fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) 46

Fluxograma 2- Esquema de preparação das amostras para microfluorescência de raios X (µXRF) 49

Fluxograma 3- Esquema de preparação das amostras para microscopia de força atômica (MFA) 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Raça, sexo, idade, tempo de progressão da diabetes mellitus e glicemia dos animais diabéticos (GDM IPEN). São Paulo, 2009 59

Tabela 2- Raça, sexo, idade, tempo de progressão da diabetes mellitus e glicemia dos animais diabéticos (GDM LISBOA). Portugal, 2009 60

Tabela 3- Concentração elementar das amostras de lentes normais do grupo controle (GCO). São Paulo, 2010 61

Tabela 4- Concentração elementar das amostras de catarata diabética (GDM IPEN). São Paulo, 2009.....61

Tabela 5- Concentração elementar das amostras de catarata diabética (GDM LISBOA). Portugal, 2009 62

Tabela 6- Valores de elasticidade obtida no grupo controle (GCO) e grupo catarata (GCAT). São Paulo, 2010 72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Representação gráfica com os valores das concentrações cálcio para os grupos controle (GCO), grupo dos diabéticos IPEN e Lisboa (GDM IPEN e GDM LISBOA) 63

Gráfico 2- Representação gráfica com os valores das concentrações de ferro para os grupos controle (GCO), grupo dos diabéticos IPEN e Lisboa (GDM IPEN e GDM LISBOA) 64

Gráfico 3- Representação gráfica com os valores das concentrações de cobre para os grupos controle (GCO), grupo dos diabéticos IPEN e Lisboa (GDM IPEN e GDM LISBOA) 65

Gráfico 4- Representação gráfica com os valores das concentrações de zinco para os grupos controle (GCO), grupo dos diabéticos IPEN e Lisboa (GDM IPEN e GDM LISBOA) 66

Gráfico 5- Representação gráfica com os valores de elasticidade para o grupo controle (GCO) e grupo catarata (GCAT) 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
ATPase	Adenosina trifosfatase
ATP	Adenosina trifosfato
ml	Mililitros
mm	Milímetros
µm	Micrômetro
µXRF	Microfluorescência de raios X
XRF	Fluorescência de raios X
$\mu g\ g^{-1}$	Micrograma por grama a menos um
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
EDXRF	Fluorescência de raios X por energia de dispersão
cm	Centímetro
kV	Quilovolt
mA	Miliampére
mm^2	Milímetros quadrado
mg/dl	Miligramas por decilitro
HPGe	Germânio hiperpuro
eV	elétron-volt
keV	Quilo elétron-volt
Ca	Cálcio
Fe	Ferro
Cu	Cobre
Zn	Zinco

MFA	Microscopia de Força Atômica
DM	Diabetes mellitus
n	Número
nm	Nanômetro
N/m	Newton por metro
kHz	Quilo Hertz
kpa	Quilo Pascal

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
x	vezes
µ	mícron
%	porcento
=	igual
<	menor

SUMÀRIO

1 **ESTADO DA ARTE** 20
2 **REVISÃO DE LITERATURA** 23
2.1 **Diabetes Mellitus** 23
2.2 **Catarata Diabética** 26
2.3 **Elementos Químicos na Catarata Diabética** 32
2.4 **Alterações Estruturais e Biomecânicas da Cápsula Anterior da Lente na Catarata** 38
3 **OBJETIVO** 41
4 **MATERIAIS E MÉTODOS** 42
4.1 **Animais e Tecido Biológico** 42
4.2 **Técnicas Experimentais** 43
4.2.1 Fluorescência de Raios X 43
4.2.1.1 Preparação e Análise pela Fluorescência de raios X por Dispersão de Energia (EDXRF) 46
4.2.1.2 Preparação e Análise pela Microfluorescência de raios X (µXRF) 48
4.2.2 Microscopia de Força Atômica 50
4.2.2.1 Preparação das Amostras e Análise por Microscopia de Força Atômica 53
4.3 **Análise Estatística** 56
5 **RESULTADOS** 58
5.1 **Análise Quantitativa por EDXRF** 58
5.2 **Mapeamento Bidimensional da Concentração Elementar por µXRF** 67
5.3 **Propriedade Elástica da Cápsula Anterior da Lente por MFA** 70
6 **DISCUSSÃO** 73
6.1 **Concentração Elementar** 74
6.2 **Mapas de Distribuição Elementar** 78
6.3 **Elasticidade da Cápsula Anterior da Lente** 81
7 **CONCLUSÃO** 84
REFERÊNCIAS 85
ANEXO 95

1 ESTADO DA ARTE

Os órgãos dos sentidos estão diretamente associados à qualidade de vida tanto para o homem quanto para os animais. Existe cada vez mais um aumento no tempo vida dos animais de companhia, os quais mantêm uma relação muito próxima com os humanos, compartilhando o mesmo estilo de vida e conseqüentemente acabam sendo expostos aos mesmos fatores ambientais.

A visão é o mais complexo sistema sensorial, não apenas pela diversidade de informações que passam por ele, mas pela capacidade de se adaptar a comunicação entre outras espécies. Através da visão os animais são capazes de decodificar informações sobre velocidade, distância, sensação de perigo e atos simples em detrimento da sobrevivência. Algumas doenças oculares, a exemplo da catarata podem evoluir a cegueira e com isso comprometer a qualidade de vida do animal, a qual influencia diretamente no bem estar do homem.

Segundo a última avaliação da OMS (Organização Mundial da Saúde), a catarata, entre todas as doenças oculares que causam baixa visão, é responsável por 48% da cegueira do mundo, o que representa dezoito milhões de pessoas acometidas pela doença. Embora o tratamento cirúrgico da catarata venha sendo realizado com êxito pelos profissionais da área, e mesmo com o advento de novas técnicas cirúrgicas na última década, visando diminuição de tempo cirúrgico e menor complicação no pós-operatório, os altos índices da doença e serviços cirúrgicos insuficiente em muitos países não permite contemplar todos os pacientes o que contribui para que esta doença seja a uma das principais causa de cegueira em todo o mundo. A OMS ressalta ainda que algumas doenças, a exemplo da diabetes mellitus, são consideradas como um fator de risco adicional para formação da catarata. Atualmente recomenda-se uma avaliação criteriosa dos pacientes diabéticos em relação aos sinais clínicos e diagnóstico do diabetes mellitus por meio de testes dos níveis glicêmicos. A mesma avaliação criteriosa é utilizada na medicina veterinária (OMS, 2010).

O diabetes mellitus é uma das mais freqüentes doenças endócrinas que afetam cães de meia idade e de idosos (FLEEMAN; RAND, 2001). É resultado da deficiência relativa e absoluta da produção de insulina (FELDMAN; NELSON, 2004).

O diabetes mellitus pode ser classificado como tipo 1 e 2, baseando-se na classificação da doença em humanos. O diabetes mellitus tipo 1 é caracterizado pela destruição ou perda de células β. O diabetes tipo 2 é caracterizado pela resistência insulínica ou produção inadequada de insulina (FELDMAN; NELSON, 2004). Das complicações crônicas associadas à diabetes uma das mais importantes é a formação da catarata, promovendo cegueira rapidamente. E a insulinoterapia é o principal tratamento em todos os cães afetados (FLEEMAN; RAND, 2001).

A catarata é a opacificação da lente (ou cristalino) do olho que impede a passagem da luz. A etiologia é variada podendo ser, congênita, hereditária ou causada por doença sistêmica, toxicidade, trauma ou idade (GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997).

A incidência da catarata em cães é muito alta, cerca de 68% dos pacientes com diabetes mellitus possuem opacificação lenticular (BASHER; ROBERTS, 1995). Os cães possuem alta predisposição para a ocorrência da diabetes mellitus, e apresentam-se susceptibilidade única para desenvolver catarata secundária a diabetes, quando comparado com os gatos e os humanos (BEAM; CORREA; DAVIDSON, 1999).

O mecanismo físico-químico responsável pelo desenvolvimento da catarata ainda é pouco compreendido. O que reforça o interesse na caracterizar o mecanismo que resulta na alteração do tecido em pacientes diabéticos (CEKIC; BARDAK, 1998). Com base nesse aspecto, a aplicação de técnicas modernas para a avaliação das causas da formação da catarata em pacientes diabéticos tem sido intensificada nesta pesquisa.

O conhecimento do comportamento dos elementos químicos e as alterações biomecânicas na catarata diabética são alvos de importantes pesquisas na clínica oftalmológica.

Esta pesquisa foi implementada com a finalidade de determinar a concentração química de elementos em catarata diabética por meio da fluorescência de raios X e microscopia de força atômica, analisar as mudanças na composição química em catarata diabética, e determinar as alterações na elasticidade da cápsula anterior da lente decorrentes do diabetes mellitus, considerando as particularidades da catarata diabética no cão.

O estudo do mecanismo de formação da catarata diabética se faz necessário para o diagnóstico e tratamento, visando à prevenção e o restabelecimento da visão no homem e nos animais acometidos pelo diabetes mellitus.

As pesquisas na área de oftalmologia veterinária têm crescido como uma unidade multidisciplinar incluindo pesquisas básicas tais como: física, biológica e biomédica, estudos clínicos e psicofísicos, ética e leis médicas. Existem muitos tópicos de relevância significativa para a área, entretanto, considera-se imprescindível contribuir com fundamentação sistemática no desenvolvimento de tecidos durante o envelhecimento e instauração de doenças. Essa dissertação foi concebida na perspectiva de associar informações multidisciplinares dando destaque ao diagnóstico, caracterização química e propriedades biomecânicas de tecidos oculares.

2 **REVISÃO DE LITERATURA**

A revisão de literatura foi divida em alguns tópicos relevantes ao tema descritos a seguir:

2.1 **Diabetes Mellitus**

O diabetes mellitus é caracterizado por uma deficiência relativa ou absoluta de insulina pelas células β, das ilhotas de Langerhans no pâncreas, que secretam insulina. Cabe salientar que deficiência de insulina, provoca nos tecidos redução da glicose, aminoácidos, e dos ácidos graxos, acelerando a glicogenólise e a gliconeogênese. A glicose obtida da dieta ou da gliconeogênese hepática acumula-se na circulação, causando hiperglicemia. A concentração de glicose sangüínea aumenta, atingindo valores de 180 a 220mg/dl no cão, excedendo a capacidade das células tubulares renais reabsorverem a glicose com base no ultrafiltrado glomerular e resultando em glicosúria. A glicosúria cria diurese osmótica, causando poliúria. A ingestão excessiva de água (polidipsia) compensatória evita a desidratação (NELSON, 2004; FELDMAN; NELSON, 2004).

O metabolismo protéico e lipídico é afetado pela diminuição da glicose, resultado em degradação do músculo e gordura para a produção hepática da glicose, esta condição catabólica provoca perda de peso. A quantidade de glicose que entra nas células do centro da saciedade, localizado no hipotálamo, afeta diretamente a sensação da fome, com a falta relativa ou absoluta de insulina, a glicose não entra no centro da saciedade, o indivíduo se torna polifágico a despeito da hiperglicemia (NELSON, 2004; FELDMAN; NELSON, 2004).

Em decorrência destas alterações, os sinais clínicos característicos do diabetes mellitus são poliúria, polidipsia, polifagia ou perda de peso (NELSON, 2004; FELDMAN; NELSON, 2004; CATCHPOLE et al., 2005).

Até o momento não há um critério aceito para a classificação do diabetes mellitus em cães. Se o critério estabelecido para humanos for aplicado para cães, a maioria dos cães diabéticos pode ser classificada como tipo 1 (FLEEMAN; RAND, 2001). A classificação baseia-se nos mecanismos fisiopatológicos e nas alterações patogênicas que afetam as células β, sendo assim podem ser classificado como tipo 1 e tipo 2. O diabetes mellitus tipo 1 caracteriza-se pela destruição ou perda de células β (NELSON, 2004; FELDMAN; NELSON, 2004), no qual a hiperglicemia é devido à hipoinsulinemia (CATCHPOLE et al., 2005) e o diabetes mellitus tipo 2 caracteriza-se pela resistência insulínica ou produção inadequada de insulina (NELSON, 2004; FELDMAN; NELSON, 2004).

Fatores como a obesidade, exposição a toxinas ou drogas que causem a resistência insulínica, destruição imuno-mediada das ilhotas de Langerhans, ou destruição das ilhotas secundária a pancreatite. Todos esses aspectos corroboram para que a doença seja considerada como multifatorial (GUPTILL; GLICKMAN; GLICKMAN, 2003). Foram encontrados anticorpos contra células β, em 50% de cães diabéticos, o que sugere um componente imunológico na etiologia desta doença (HOENING, 2002). Endocrinopatias, como o hiperadrenocorticismo, podem causar resistência insulínica e conseqüentemente a diabetes (FLEEMAN; RAND, 2001).

As fêmeas ocasionalmente desenvolvem diabetes durante o diestro ou gestação (FELDMAN; NELSON, 2004), semelhante ao diabetes gestacional que ocorre em humanos (RAND et al., 2004), defini-se como um grau variável de intolerância a glicose, que se inicia ou é reconhecido pela primeira vez durante a gestação (FLEEMAN; RAND, 2001). A alta concentração de progesterona e hormônio do crescimento na circulação durante o diestro, antagoniza a ação insulínica causando resistência a glicose. Um estudo realizado no Reino Unido apontou que as fêmeas possuem um maior risco a esta afecção e apontam que 53% dos animais diabéticos são fêmeas (CATCHPOLE et al., 2005).

O diabetes mellitus é uma das mais freqüentes doenças endócrinas que afetam cães idosos e de meia-idade (RAND et al., 2004). Esta afecção é diagnosticada em cães com idade entre 4 e 14 anos, com prevalência em 7 e 10 anos de idade (FELDMAN; NELSON, 2004). Estudo desenvolvido por Safatle (2008), que reuniu 37 cães diabéticos para avaliar a integridade retiniana por meio do eletroretinograma de campo total, apontou que a idade média desses animais foi

de 10,2 anos. O diabetes juvenil ocorre em cães com menos de um ano de idade e é incomum (FELDMAN; NELSON, 2004).

A prevalência do diabetes vem aumentando, em um hospital veterinário nos Estados Unidos, na década de 70, esta afecção atingia dezenove a cada dez mil casos atendidos, e, em 1999, cinqüenta e oito casos novos de diabetes mellitus foi diagnosticado a cada dez mil casos (GUPTILL; GLICKMAN; GLICKMAN, 2003).

Certas raças de cães apresentam predisposição ao diabetes (CATCHPOLE et al., 2005). Foi identificado que raças mistas apresentam risco maior de serem acometidos comparados com cães de raça pura, sendo estas, Bichon Frisé, Terrier Australiano, e Schnauzer (GUPTILL; GLICKMAN; GLICKMAN, 2003). No entanto, o estudo realizado por Safatle (2008), avaliou-se diversas raças, dentre os cães diabéticos, os mais comuns foram Poodle, Fox Paulistinha, Pastor e SRD (sem raça definida).

Nas principais manifestações oculares do diabetes em cães estão incluídas formação da catarata, perda de células endoteliais da córnea, pleomorfismo e polimegatimo do endotélio corneal e lesão vascular retiniana, como microaneurismas. Efeitos ceratoconjuntivais relatados em cães diabéticos, como diminuição da produção e do tempo de quebra do filme lacrimal, aumento da sensibilidade corneal, elevação da concentração de glicose na lágrima (CULLEN; WEBB, 2007).

A formação da catarata é a mais comum e uma das mais importantes complicações da diabetes mellitus em cães (BASHER; ROBERTS, 1995; FELDMAN; NELSON, 2004). A incidência da catarata diabética em cães é muita alta, em parte porque muito desses animais apresentam uma hiperglicemia significante a despeito da terapia insulínica (FELDMAN; NELSON, 2004). A maior parte dos cães diabéticos desenvolve catarata, e progridem rapidamente para cegueira (BASHER; ROBERTS, 1995).

Com relação aos fluídos oculares estudos indicam que o aumento da concentração da glicose no humor aquoso, além de provocar a formação da catarata, promove alterações na retina de cães, em comparação com os humanos, sendo menos importantes, e limitadas à formação de microaneurismas devido à perda de pericitos da parede dos capilares retinianos, em conjunto com outras mudanças morfológicas dos vasos retinianos (BASHER; ROBERTS, 1995).

2.2 **Catarata Diabética**

A lente (ou cristalino) é uma estrutura avascular, transparente e altamente organizada, responsável pela refração da luz para um determinado ponto da retina (DAVIDSON; NELMS, 2007).

A despeito da sua estrutura anatômica simples, a lente possui uma série altamente refinada de processos bioquímicos que mantêm sua transparência durante toda a vida do animal. A perda da transparência é o processo mais comum de todas as afecções que afetam a lente, devido à prevalência de doenças hereditárias em lentes de cães, a catarata é a mais comum de todas as lesões intra-oculares, levando a perda da visão nesta espécie (DAVIDSON; NELMS, 2007).

A lente é constituída por cápsula (anterior e posterior), córtex e núcleo (LAUS et al., 2008). E junto a cápsula anterior há uma única camada de células epiteliais da lente (SAMUELSON, 2007), que tem papel importante na formação de novas fibras lenticulares (STAFFORD, 2001). A cápsula da lente atua como um envoltório atuando, juntamente com os ligamentos zonulares, na manutenção da forma da lente (LAUS et al., 2008). A sua face anterior em esta localizada posteriormente à íris, e sua face posterior em contato com o humor vítreo (GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997).

A lente se compõe, aproximadamente, por 65% de água e 35% de proteínas, sendo a estrutura mais rica em proteína do organismo. Suas proteínas podem ser classificadas, segundo a solubilidade em água, em solúveis (cristalinas) e insolúveis (albuminóides) e, de conformidade com seu tamanho molecular, em alfa, beta e gama cristalinas (LAUS et al., 2008). Em comum com a córnea, a lente tem duas principais propriedades ópticas: transparência e poder refrativo (STAFFORD, 2001).

A transparência é mantida por um número de fatores complexos, incluindo baixa densidade citoplasmática devido à falta de organelas intracelulares e núcleo celular nas fibras da lente, pequena flutuação do índice refrativo do citoplasma e arranjo altamente organizado das fibras da lente. Esses fatores são influenciados pela hidratação citoplasmática, força iônica, e outras funções metabólicas especiais (DAVIDSON; NELMS, 2007).

Por ser avascular, a nutrição e oxigenação da lente é feita tomando por base o humor aquoso. A glicose é a fonte de energia mais importante. O metabolismo da lente é mais ativo no equador, sendo predominantemente mediado por glicólise anaeróbica e, em menor grau, pela via do sorbitol e ciclo de Krebs. As proteínas lenticulares que ganham a câmara anterior são capazes de induzir a reações imunomediadas. Qualquer evento que altere o seu metabolismo ou sua estrutura é capaz de produzir catarata (LAUS et al., 2008).

A catarata, por definição, é a opacificação da lente ou de sua cápsula (GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997). No momento que a catarata é evidente clinicamente, e certamente observada uma opacificação moderada a severa, alterações metabólicas graves e irreversíveis na lente ocorreram em razão de uma série de eventos relacionados com o conteúdo protéico, trocas metabólicas, concentrações iônicas, e atividade antioxidantes (DAVIDSON; NELMS, 2007; LAUS et al., 2008).

Cataratas estão associadas com o aumento do peso molecular das proteínas insolúveis (albuminóides) que normalmente compreendem 15% do total de proteínas da lente e um decréscimo na quantidade relativa de proteínas solúveis (cristalinas). Também estão associadas com o decréscimo da bomba de sódio, potássio, ATPase na célula epitelial, o que pode causar um aumento do conteúdo de sódio e cálcio, e queda de potássio na lente. O consumo de oxigênio e produção de ATP cai e a atividade antioxidante diminui, incluindo queda dos níveis e redução da glutadiona, vitamina C e E, e superóxido dismutase (DAVIDSON; NELMS, 2007).

Em humanos, baixos níveis de vitamina C, vitamina E, e carotenóides têm sido associados com alto risco de catarata senil. Os cães são mais propensos ao desenvolvimento da catarata. Um decréscimo das defesas antioxidantes pode ser responsável pelo aumento da oxidação lenticular e formação da catarata. Os altos níveis de ácido ascórbico no humor aquoso têm sido propostos como proteção natural contra a foto-oxidação (BARROS et al., 1999). Entretanto, Barros et al. (1999) relatou a diminuição dos níveis de ácido ascórbico em cães da raça Cocker Spaniel portadores de catarata, o que pode contribuir para o desenvolvimento da catarata. A lente e a retina são os tecidos mais acometidos pelo estresse oxidativo, que é gerado pela foto-oxidação (WILLIAMS, 2008).

As alterações patológicas progridem conforme a gravidade da opacificação ocorrendo aumento da atividade proteolítica e hidrolítica, ruptura da membrana

celular, que está associada a um dano irreversível, perda de proteínas de baixo peso molecular, e aumento do conteúdo de água. A mudança da pressão colóide osmótica intracelular causa aumento da concentração de cátions (aumento de sódio e diminuição de potássio). Em virtude da degradação de proteínas em aminoácidos e polipetídeos, promove assim a difusão de produtos de proteólise através da lente. A perda de água e material nitrogenado pode causar encolhimento da lente, como observado na catarata hipermadura (DAVIDSON; NELMS, 2007).

A classificação mais comumente utilizada para classificar catarata canina, abordando a etiologia, curso ou progressão, associado ao déficit visual e a ocorrência de doenças oculares como uveíte lente-induzida (DAVIDSON; NELMS, 2007), sendo esta a mais comum complicação da catarata (PARK et al., 2009).

Em estudo realizado com 2000 cães, na Inglaterra, com o objetivo de avaliar a prevalência da catarata na população canina, demonstraram que a catarata aumentou com o avanço da idade, e cães com idade acima dos 13,5 anos neste estudo possuíam algum grau de opacidade na lente. Essas opacidades raramente eram maduras e não necessariamente poderiam progredir para este estágio. Não houve diferença estatística entre os animais de diferentes sexos (WILLIAMS; HEATH; WALLIS, 2004).

Em 2005, Gelatt e MacKay realizaram um estudo retrospectivo que determinou a prevalência da catarata canina nos Hospitais Veterinários na América do Norte em período de quatro décadas. As raças com maior número de cães afetados pela catarata foram Boston Terrier, Poodle Miniatura, Cocker Spaniel Americano, Poodle Standard e Schnauzer Miniatura. Houve variação da idade de ocorrência da catarata entre as raças, mas em cães de raças mestiças a formação da catarata ocorreu com maior freqüência entre quatro a sete anos de idade. Em relação ao sexo, não houve diferença evidente durante este período. Sugeriu ainda que o total de animais estudados e a idade prevalente da formação da catarata em cães parecem ser muito similares com o homem.

Recentemente um estudo realizado em um Hospital Veterinário de Seul reportou que a raça mais freqüentemente acometida pela formação da catarata foi o Poodle Miniatura, e a proporção de fêmeas acometidas pela opacificação lenticular foi significantemente maior do que em machos. A idade média de formação da catarata foi de 8,3 anos (PARK et al., 2009).

A principal manifestação ocular do diabetes mellitus no cão é a formação da catarata (Figura 1). Sua formação pode variar de acordo com a espécie afetada, individualidade, idade de início da doença, duração da doença e severidade da hiperglicemia (CULLER; WEBB, 2007). Geralmente está associada a um desenvolvimento rápido, bilateral e simétrico em razão das alterações das vias metabólicas da lente (DAVIDSON; NELMS, 2007).

Fonte: Laboratório de Investigação em Oftalmologia Comparada – USP

Figura 1 – Catarata Diabética

As anormalidades oculares do diabetes resultam do aumento da concentração da glicose que atinge o olho. A nutrição e a remoção de metabólitos da lente necessitam em grande parte do humor aquoso, e em menor grau do humor vítreo. As células epiteliais e fibras da lente dependem quase que totalmente do metabolismo da glicose para produção de energia. A glicose entra na lente através do humor aquoso por difusão assistida por meio de um processo de transferência mediada. Conforme as células epiteliais se tornam fibras, as organelas intracelulares são perdidas, incluindo-se a mitocôndria. Sendo assim, mais de 70% da energia da lente provém da glicólise anaeróbica (BASHER; ROBERTS, 1995).

Com a hiperglicemia, os níveis de glicose na lente aumentam e metabolismo anaeróbico se torna saturado, causando um desvio para uma via alternativa, envolvendo a enzima aldose redutase, chamada de via sorbitol (ou poliol), que corresponde a somente 5% do metabolismo da lente (BASHER; ROBERTS, 1995; DAVIDSON; NELMS, 2007). Em 2006, Oishi et al. correlacionaram altos níveis de aldose redutase nos eritrócitos de pacientes diabéticos, o que pode assim facilitar o desenvolvimento da catarata nestes pacientes, e sugerem ainda que uso de inibidores de aldose redutase sejam de importante utilidade para prevenir a progressão da catarata diabética.

O excesso de glicose por essa via promove acúmulo de produtos do metabolismo na lente. O sorbitol não se difunde através da membrana celular, promovendo um gradiente osmótico que atrai água para as fibras lenticulares (BASHER; ROBERTS, 1995).

A água do humor aquoso é embebida para o interior da lente em conseqüência das forças osmóticas, causando mudanças na arquitetura da lente, incluindo inchaço e ruptura de suas fibras, formação de vacúolos, causando a opacificação lenticular. Adicionado a isso, uma série de mudanças bioquímicas ocorre, resultando em alterações na concentração de eletrólitos, redução da atividade e dos níveis de ATP, glutadiona, mioinositol (DAVIDSON; NELMS, 2007). Há também redução da síntese protéica, além de aumento da permeabilidade da membrana celular (BRON et al., 1993).

As mudanças na ultra-estrutura da lente de um paciente diabético comparando-se com uma lente normal é maior, devido à formação da catarata diabética, na qual a lente torna-se intumescente. Entre outras mudanças biométricas se destacam acentuação da curvatura anterior e posterior da lente e câmara anterior rasa (BRON et al. 1993).

Existem evidências de que os poliols (sorbitol) também possam interagir diretamente com as proteínas da lente por um processo não-enzimático de glicosilação (glicação, modificação covalente). Este processo também pode ser uma importante causa da catarata diabética. A glicosilação envolve a ligação de glicose a resíduos de aminoácidos nas proteínas lenticulares (cristalinas), causando agregação protéica, comprometendo a integridade da membrana celular. A glicosilação também pode provocar alterações nas enzimas lenticulares, incluindo a glutadiona redutase (BASHER; ROBERTS, 1995).

A lente é protegida do estresse oxidativo por uma gama de moléculas localizadas na membrana e citosol, que incluem vitamina E, glutadiona reduzida, ácido ascórbico, superóxido dismutase, taurina e beta-caroteno. A lente de pacientes diabéticos está sujeita a um aumento no estresse oxidativo, o que pode causar dano à membrana lenticular (BASHER; ROBERTS, 1995). Os efeitos deletérios do metabolismo da glicose e mudanças associadas ao potencial antioxidante das células epiteliais da lente podem exacerbar os efeitos do estresse oxidativo (WILLIAMS, 2006). Em 2002, Barros et al., reportaram a diminuição de ácido ascórbico no plasma e humor aquoso de cães diabéticos, o que também já havia sido proposto por Barros et al. (1999), a diminuição de ácido ascórbico em humor aquoso em cães portadores de catarata.

A espécie canina é altamente susceptível a formação da catarata diabética, essa susceptibilidade é em razão da dificuldade do controle glicêmico nesta espécie, resultando em hiperglicemia crônica. Alguns cães diabéticos, a despeito de uma boa resposta a insulinoterapia e controle glicêmico adequado, desenvolvem catarata (DAVIDSON; NELMS, 2007).

Resultados de um estudo confirmaram que aproximadamente 50% dos cães diabéticos desenvolveram catarata com 5 e 6 meses do diagnóstico, e cerca de 80% apresentaram catarata ao longo do tempo, com aproximadamente 16 meses do diagnóstico (BEAM; CORREA; DAVIDSON, 1999). Neste mesmo estudo, verificou-se que, dentre as raças não esportivas, incluindo os braquicefálicos e sharpeis, o tempo médio para formação da catarata foi de 10 dias. O fator responsável para esse achado não está bem elucidada, mas pode ser reflexo do grau de severidade da doença (BEAM; CORREA; DAVIDSON, 1999) ou capacidade inadequada de regular os níveis de glicose com a insulinoterapia em diferentes raças (BEAM; CORREA; DAVIDSON, 1999; FELDMAN; NELSON, 2004). Em relação ao sexo, as fêmeas representam a maioria dos diagnósticos de catarata diabética, comparado com os machos, tendo uma proporção de 4:1 (SAFATLE, 2008).

Ruptura espontânea da cápsula da lente também esta associada ao diabetes mellitus, além de rápida formação da catarata, o que pode ser observado por Wilkie et al. (2006), que constatou que dentre as raças acometidas pela catarata diabética e ruptura espontânea da cápsula, o labrador apresentou maior incidência.

2.3 **Elementos Químicos na Catarata Diabética**

Diversos elementos são responsáveis por inúmeras atividades bioquímicas, imunológicas e fisiológicas do organismo. Entretanto, pode haver associação entre os níveis de elementos traço em fluídos corpóreos ou tecidos e a presença de várias doenças. Alguns elementos têm importância significante no sistema imune e dependendo do elemento em particular, a concentração e outros fatores, podem levar a mecanismos de imunoestimulação ou imunosupressão (ZUCCHI et al., 2008).

Os micronutrientes estão envolvidos em um processo complexo de desenvolvimento das complicações secundárias do diabetes mellitus. Podem ser componentes fundamentais de enzimas antioxidantes, co-fatores em importantes processos enzimáticos no metabolismo do lipídio e da glicose, ou no potencial pro-oxidante. O diabetes tipo 1 e 2 são acompanhadas por alterações na absorção e excreção de micronutrientes. O maior efeito desta alteração é o declínio da capacidade do organismo em combater a produção de radicais livres (THOMPSON; GODIN, 1995). Nos pacientes diabéticos, em especial, vários órgãos vitais são afetados pela instabilidade crônica da glicemia e o aumento do estresse oxidativo (STRAIN, 1991; THOMPSON; GODIN, 1995).

O papel dos elementos traço na formação da catarata tem sido estudado, devido às alterações na concentração dos elementos traço em opacificações lenticulares, tanto em catarata de origem senil como em cataratas diabéticas, o que reforça a hipótese que alguns micronutrientes participem da formação da catarata (GUNDUZ et al., 2003).

No olho, o zinco influência no metabolismo celular através de vários mecanismos, e tem papel importante na manutenção normal da função visual. Este elemento está presente em altas concentrações no tecido ocular, particularmente na retina e na coróide, especificamente na periféria dos fotorreceptores na área tapetal (*tapetum lucidum*) de cães e gatos (GRAHN et al., 2001). Em lentes de humanos a quantidade de zinco é muito pequena e não altera com a idade (DAWCZYNSKI et al., 2002), o que já havia sido confirmado por Galin, Nano e Hall (1962). O zinco pode influenciar na integridade estrutural das proteínas, as quais estão envolvidas na manutenção da transparência da lente (BENTLEY; CHIN; GRUBB, 1984).

O zinco tem várias funções, como secreção e transporte de insulina, sensibilidade dos receptores de insulina e metabolismo enzimático da glicose. A queda do zinco pode afetar a habilidade das células β em produzir insulina (HADRZYNSKI, 1999). Numerosos estudos revelam a relação entre o zinco e o diabetes mellitus. O diabetes pode causar distúrbios na homeostasia do zinco, provocando a perda deste elemento, sobretudo através da excreção urinária (GRAHN et al., 2001), sendo este um constante achado entre pacientes diabéticos. A hiperglicemia pode ser responsável pelo aumento da perda urinária e diminuição do zinco total (HADRZYNSKI, 1999). Os níveis de zinco podem também influenciar na ação insulínica e desenvolvimento do diabetes mellitus, bem como nas complicações crônicas (GRAHN et al., 2001).

A deficiência do zinco tem sido relatada em diversas espécies, devido às alterações na ultraestrutura e eletrofisiologia que resulta em graves manifestações oculares (GRAHN et al., 2001). Por outro lado, concentrações elevadas de zinco levam a oxidação de grupos sulfídricos, o que pode potencializar a formação da catarata, em virtude do aumento na permeabilidade da membrana celular. A permeabilidade da membrana alterada promove o acúmulo de proteínas de alto peso molecular que participam da opacificação lenticular (SRIVASTAVA; VARSHNEY; PANDEY, 1992; DAWCZYNSKI et al., 2002; GUNDUZ et al., 2003).

A lente possui altas concentrações de anidrase carbônica, enzima envolvida na produção de humor aquoso, a qual contém zinco. A presença desta enzima pode explicar a quantidade deste metal na lente (GALIN; NANO; HALL, 1962; BENTLEY; CHIN; GRUBB, 1984). O zinco tem acesso na lente através do humor aquoso, atravessa a cápsula anterior e atingindo assim a membrana plasmática das células epiteliais (BENTLEY; CHIN; GRUBB, 1984).

Sendo a região do córtex metabolicamente mais ativo, é possível que acumule mais zinco quando comparada com a região nuclear da lente (DAWCZYNSKI et al., 2002). O zinco pode se ligar a vários aminoácidos, o que não influencia no processo de transporte deste metal, com possível exceção da cistina, proteína de baixo peso molecular, que pode facilitar seu acúmulo (BENTLEY; CHIN; GRUBB, 1984).

Um estudo realizado por Dawczynski et al. (2002), comparou a concentração de zinco em lentes de humanos com diferentes graus de opacificação, e concluiu que em cataratas maduras a concentração de zinco lenticular foi maior quando

comparada com cataratas corticonucleares. Neste mesmo estudo, utilizaram-se lentes de pacientes diabéticos, notando-se um aumento dos níveis de zinco, porém não significativo, quando comparada com pacientes não diabéticos. Resultado semelhante foi obtido por Gunduz et al. (2003), que comparou cataratas senis e diabéticas, o que reforça a hipótese que a presença do zinco em níveis elevados na lente facilita a formação da catarata em pacientes diabéticos.

Elementos traço como o cobre são essenciais para a manutenção das funções fisiológicas normais (LIN, 1997). O cobre é essencial para a atividade de numerosas enzimas, como citocromo oxidade, superóxido dismutase, uricase (COOK; MCGAHAN, 1986) e tirosinase (AYDIN et al., 2005). Mudanças no metabolismo e na concentração do cobre em alguns tecidos e fluídos corpóreos têm sido associadas com estágios patológicos. Depósito de cobre na córnea é considerado patognômonico de toxicose cúprica hereditária (Doença de Wilson) no homem (COOK; MCGAHAN, 1986). Em ratos com diabetes induzida experimentalmente, a concentração de cobre no sangue, fígado, rins e duodeno são elevadas. A concentração sanguínea de cobre também é elevada em humanos diabéticos (LIN, 1997).

O cobre pode potencializar a peroxidação lipídica e as alterações oxidativas (THOMPSON; GODIN, 1995). A peroxidação lipídica é também um fator na cataractogênese, que podem gerar derivados que atuam como mensageiros tóxicos no estresse oxidativo, e mudanças na composição lipídica da lente levam a aumento da permeabilidade da membrana e conseqüentemente a opacificação lenticular (WILLIAMS, 2008).

O aumento da concentração de cobre pode exacerbar o estresse oxidativo na diabetes e a sobrecarga renal pode contribuir para a nefropatia diabética, entre outras complicações (THOMPSON; GODIN, 1995). Há relatos de hipercupremia em pacientes diabéticos com complicações que incluem retinopatia, hipertensão e doenças vasculares quando comparado com pacientes diabéticos sem complicações secundárias a diabetes (HADRZYNSKI, 1999).

Os órgãos que naturalmente possuem maior concentração de cobre no organismo são o fígado e cérebro, sendo o cérebro o único órgão do qual o cobre se eleva com a idade. Tecidos oculares pigmentados possuem alta concentração de cobre. Sabe-se que a concentração de cobre se eleva na diabetes mellitus, portanto, o cobre pode estar associado com a formação da catarata diabética (LIN, 1997).

Em um estudo realizado por Aydin et al. (2005), investigou e comparou os níveis de zinco, ferro, e cobre no humor aquoso, lente e no plasma de humanos diabéticos e não diabéticos, pode concluir que a concentração de cobre e a relação de cobre/zinco em lentes de pacientes diabéticos foram significantemente maiores, porém não houve diferença estatística nos outros elementos avaliados. Outro estudo que mensurou os níveis de íons cobre em cataratas diabéticas e não diabéticas, demonstrou um aumento significativo de íons cobre em pacientes diabéticos. Observou também uma diminuição na atividade da enzima superóxido dismutase neste grupo, validando o aumento do estresse oxidativo nestes pacientes (LIN, 1997).

Há dois fatores que podem causar o aumento do cobre na opacidade lenticular: i) aumento da permeabilidade vascular que resulta em quebra da barreira hemato-aquoso, e conseqüentemente aumento do cobre na lente; ii) nos pacientes diabéticos a hiperglicemia induz a glicação de enzimas e proteínas presentes no tecido ocular que contêm cobre e resultam em desprendimento do elemento deste metal que induz reações oxidativas, tendo como resultado a desnaturação da membrana lipídica e perda da sua funcionalidade e conseqüentemente a formação da catarata (LIN, 1997).

Vários estudos com animais diabéticos modelos e em humanos diabéticos revelam aumento dos níveis de cálcio intracelular de muitos tecidos. Alterações na regulação do cálcio têm sido descritas nas complicações vasculares, alterações renais, hepáticas, neurais e oculares de animais diabéticos (LEVY; GAVIN; SAWERS, 1994).

Níveis elevados de cálcio também estão relacionados a diversos processos patológicos (TANG et al., 2003), concomitante a inflamação intra-ocular, administração de drogas intra-oculares que contenham grande quantidade de cálcio e fósforo ou a calcificação distrófica, pode provocar a elevação deste elemento no olho (KIM; CHOIN, 2007).

A atividade das bombas de membrana, como adenosina trifosfato (ATPase) associadas a bombas de cátions, os quais determinam os níveis intracelulares de cálcio, encontram-se alterados no diabetes mellitus. A habilidade da célula em regular a entrada e saída de cálcio está comprometida tanto na diabetes, obesidade, hipertensão e o avanço da idade, o que pode levar a resistência insulínica. O cálcio intracelular atua como um mediador na ação da insulina, níveis muito baixos ou

elevados de cálcio estão associados a um prejuízo na ação da insulina (LEVY; GAVIN; SOWERS, 1994; LEVY, 1999).

A formação da catarata é uma das principais complicações da diabetes mellitus, e também uma importante alteração com o avanço da idade. (LEVY; GAVIN; SOWERS, 1994).

Com a idade, o aumento de cálcio na lente é contrabalanceado com o aumento da atividade da bomba cálcio-ATPase. Com a catarata, no entanto, a permeabilidade da membrana da lente e a quantidade de cálcio total se elevam, porém a atividade da bomba cálcio-ATPase cai pela metade (TANG et al., 2003). Este fato foi confirmado por Tang et al. (2003) que analisou os níveis de cálcio em lentes com catarata. O valor de cálcio foi bastante expressivo em lentes com catarata cortical, sendo quatro vezes maior quando comparado às lentes controle. Neste mesmo estudo também analisou os níveis de cálcio em lentes de pacientes diabéticos, e verificou que não houve diferença estatística do cálcio total.

Contudo, Hightower e Misiak (1998) induziram experimentalmente catarata galactosêmica em ratos, puderam notar que houve um aumento de 10% do cálcio total, e foi possível observar o primeiro sinal de opacificação lenticular no quarto dia pós-indução da catarata. No décimo segundo dia do experimento houve um aumento significativo de cálcio total acompanhado por uma densa opacificação da lente. Avaliou também a concentração de outros cátions como o sódio e o potássio, onde houve aumento da concentração de sódio e diminuição do potássio, reiterando que a alteração da bomba de cátions é importante fator na formação da catarata. Estes achados sugerem que a elevação de cálcio é um fator crítico para o processo de opacificação na catarata galactosêmica.

Os níveis de cálcio lenticular e os efeitos da droga Verapamil, que age como antagonista do cálcio, foram analisadas por Cekic e Bardak (1998), em lentes de ratos diabéticos induzidos experimentalmente. Houve aumento dos níveis de cálcio na lente dos animais diabéticos quando comparado ao grupo controle, e foi possível observar uma redução da opacificação e dos níveis do cálcio lenticular com o uso da droga. Pierce et al. (1989) também demonstraram a eficácia do Verapamil durante a formação da catarata em ratos diabéticos, com redução de 41% da incidência em 4 semanas, indicando uma relação direta entre os níveis de cálcio com a formação da catarata diabética.

O ferro é pouco afetado pela diabetes mellitus, entretanto seu papel na formação de radical livre, e o aumento do estresse oxidativo na diabetes, podem ocasionar a complicações a pacientes diabéticos (THOMPSON; GODIN, 1995). Os radicais livres são fundamentais para a patofisiologia de inúmeras doenças, e o ferro funcionando como um catalisador é o maior atuante nestes processos. Especificamente no olho, os radicais livres participam na injúria ao tecido, o que contribui para muitas doenças, incluindo a formação da catarata, doenças corneanas, degeneração retiniana, retinopatia diabética, glaucoma e entre outras (GORALSKA et al., 2009).

A concentração de ferro no humor aquoso e vítreo é muito pequena, menos de 1% em relação ao plasma sanguíneo, o que reflete na habilidade da barreira hemato-aquoso em transportar o ferro para o olho. Ressalta-se que a lente possui um controle adequado do conteúdo de ferro. O ferro é mantido na forma de proteína. A ferritina permite um armazenamento seguro do ferro, prevenindo a interação deste em reações de dano oxidativo (GORALSKA et al., 2009)

No processo inflamatório na qual ocorre há a quebra barreira hemato-aquoso, a lente acumula ferro, uma das hipóteses apontada na literatura refere-se ao aumento plasmático da tranferrina e da não-transferrina ligada ao ferro, incorporadas nos fluídos intra-oculares. Uma das hipóteses apontadas na literatura refere-se que a concentração de ferro na lente reduz-se após o episódio inflamatório. Nota-se que a lente possui um mecanismo de remoção de ferro que podem ser potencialmente prejudiciais e também controla a liberação de ferro, mantendo-o em limites toleráveis. Devido à idade, estes mecanismos podem estar alterados, e tais mudanças contribuem para o acúmulo de ferro e estresse oxidativo observado na cataractogênese (GORALSKA et al., 2009).

Um estudo determinou a concentração de ferro em cataratas senis, utilizando somente a área nuclear, e comparou com lentes normais, concluiu-se que a concentração de ferro determinado apresentou-se com valores maiores para as amostras de cataratas senis, indicando que o ferro pode atuar da oxidação e peroxidação de moléculas biológicas (CEKIC et al., 1999).

A concentração de ferro também foi avaliada, por Dawczynski et al. (2002) e por Aydin et al. (2005), em cataratas diabéticas e comparadas com cataratas senis, houve aumento dos níveis de ferro em lentes diabéticas. Resultado semelhante foi obtido por Cekic e Bardak (1998) com lentes de ratos diabéticos induzidos

experimentalmente, os níveis de ferro lenticular foram significantemente elevados no grupo dos animais diabéticos comparado ao grupo controle, o que confirma a hipótese do desbalanço eletrolítico que ocorre no diabetes mellitus.

2.4 **Alterações Estruturais e Biomecânicas da Cápsula Anterior da Lente na Catarata**

A lente é uma estrutura refrativa e responsável por focar a imagem na retina para a formação da visão. Nos mamíferos, a lente é biconvexa, e seu poder óptico é realizado pelo fenômeno de acomodação devido à elasticidade natural de sua cápsula e flexibilidade das substâncias da lente (SLATTER, 2005; SAMUELSON, 2007). Em mamíferos jovens, a lente é bastante macia, composta somente de um núcleo pequeno, denso e centralizado. O núcleo se torna maior e mais denso com a idade, o que reduz a habilidade de acomodação da lente com a idade (SAMUELSON 2007).

A lente é proporcionalmente maior nos animais domésticos comparada com os humanos. A lente do cão tem o volume de aproximadamente 0,5 ml, e cerca de 7 mm de espessura do pólo anterior ao posterior. O diâmetro equatorial é de aproximadamente 10 mm. A cápsula da lente possui de 8 a 12 µm de espessura na região do equador, na porção anterior uma espessura de 50 a 70 µm, e de 2 a 4 µm de espessura na cápsula posterior (GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; SAMUELSON, 2007). A cápsula da lente consiste de fibrilas e uma membrana basal disposta de forma lamelar (STAFFORD, 2001; SAMUELSON, 2007). Como toda membrana basal, o principal componente da cápsula da lente é o colágeno tipo IV, o qual é densamente espesso, constituindo uma rede de microfibrilas dispostas de forma tri-dimensional, (KRAG; ANDREASSEN, 2003; SAMUELSON, 2007; DANYSH; DUNCAN, 2009) e pequenas quantidades de colágeno tipo I e III, (BRON et al., 2000) proporcionando elasticidade à cápsula (STAFFORD, 2001).

Apenas a cápsula anterior da lente possui uma única camada de células epiteliais. Somente as células epiteliais podem produzir novo material da membrana basal da cápsula. Ao passo que a cápsula posterior da lente não possui células

epiteliais, as quais foram consumidas no período embrionário para formar as primeiras fibras da lente (SAMUELSON, 2007).

A espessura da cápsula da lente aumenta continuadamente durante toda a vida, novas fibras são formadas juntamente com a deposição de novas lamelas da membrana basal da cápsula (STAFFORD, 2001; SAMUELSON, 2007). Ultra-estruturalmente, a aparência lamelar da cápsula anterior desaparece rapidamente com a idade (KRAG; ANDREASSEN, 2003; SAMUELSON, 2007).

A região equatorial da lente é altamente proliferativa, na qual ocorre mitose celular aproximadamente no mesmo instante em que são formadas novas fibras da lente. Na medida em que as células epiteliais da lente se tornam fibras ocorre uma compressão sobre as fibras já formadas (SAMUELSON, 2007). No alongamento e diferenciação das células epiteliais em fibras, as organelas citoplasmáticas são perdidas, entretanto ocorre um aumento das interdigitações, essas junções se proliferam em torno da membrana cobrindo de 5% a 60% da superfície, sendo estas um tipo único encontrado somente nas fibras da lente. As junções permitem a comunicação metabólica, permitindo a passagem de pequenas moléculas através da lente avascular (STAFFORD, 2001).

Com o aumento no volume da lente durante a vida, há um aumento da extensão periférica das cápsulas anterior e posterior da lente e uma expansão da camada epitelial da lente. O número de células epiteliais aumenta com a idade, ao passo que a densidade diminui (BRON et al., 2000). O decréscimo na densidade celular do epitélio lenticular também foi observado em pacientes com catarata diabética e não diabética, e pode haver relação com a formação da catarata, devido à queda da função celular (TKACHOV et al., 2006).

A cápsula anterior da lente, importante estrutura na cirurgia da catarata, está associada com a perda progressiva da elasticidade com avanço da idade. A cápsula se torna mais espessa, menos elástica e muito mais frágil (KRAG; OLSEN; ANDREASSEN, 1997). Em razão desta mudança, algumas hipóteses sugerem que alterações no arranjo das fibras colágenas da cápsula da lente favoreçam a perda da elasticidade, como o aumento do volume da lente provocando maior tensão sobre a estrutura de colágeno limitando a acomodação da lente (KRAG; ANDREASSEN, 2003). E outro fator pode estar associado, como modificações pós-translacional das moléculas como glicosilação não-enzimática, que pode alterar as propriedades

mecânicas da cápsula da lente através da formação de ligações cruzadas estáveis (KRAG; ANDREASSEN, 2003; BRON et al., 2000).

O processo glicação ou glicosilação não-enzimática pode ocorrer em lentes de pacientes diabéticos, devido à hiperglicemia crônica, resultando em alteração da estrutura e das propriedades mecânicas da membrana basal. Na cápsula anterior da lente esta alteração pode causar fragilidade e rigidez (DANYSH; DUNCAN, 2009). Tal fragilidade havia sido descrita por Ramsell (1969) em pacientes diabéticos submetidos à cirurgia de catarata, o qual notou maior índice de ruptura da cápsula e alto risco de complicações nestes pacientes.

Com o avanço progressivo da catarata, a cápsula anterior e posterior pode tornar-se mais finas com o intumescimento da lente, e enrugadas em estágios avanços de desenvolvimento da catarata (DAVIDSON; NELMS, 2007).

Em estudo que avaliou a espessura da cápsula anterior da lente de cães normais e com catarata, verificou-se um aumento progressivo da espessura da cápsula com a idade, o qual não houve diferença significativa entre lentes normais e com catarata. Entretanto, lentes com catarata apresentaram metaplasia das células epiteliais em forma de placas, morfologicamente similar as alterações encontradas em lentes cataractogênicas de humanos (BERNAYS; PEIFFER, 2000).

3 **OBJETIVO**

Analisar e comparar através da técnica de Fluorescência de Raios X as alterações composição química em lentes de cães portadores de Diabetes Mellitus.

Verificar o uso da técnica de Microscopia de Força Atômica para determinar as propriedades biomecânicas da cápsula anterior da lente associado à catarata, na espécie canina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e Tecido Biológico

Foram analisadas 37 lentes e 15 cápsulas de lente de 47 cães (38 fêmeas e nove machos) de diversas raças. Os Animais diabéticos foram encaminhados inicialmente para o Serviço de Clínica Médica do Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo para avaliação do estado geral, diagnóstico e controle do diabetes mellitus, em seguida foram avaliados por exame oftalmológico completo. As cataratas foram consideradas secundárias a diabetes mellitus em virtude do histórico de rápida progressão da opacidade e freqüentemente bilateral. Por apresentarem catarata, os animais foram encaminhados ao Serviço de Oftalmologia, onde foram avaliados por exame oftalmológico completo e tiveram seu estágio de desenvolvimento classificado em incipiente, imatura, madura ou hipermadura.

Durante o atendimento oftalmológico foram coletadas informações referentes aos pacientes, como raça, idade, sexo, tempo de desenvolvimento da diabetes e glicemia. Os principais exames oftalmológicos realizados nos pacientes com catarata foram:

- Tonometria (instrumento utilizado para avaliação da pressão intra-ocular).
- Biomicroscopia com lâmpada de fenda (equipamento útil para exame do segmento anterior do globo ocular).
- Eletrorretinografia (exame realizado para avaliar a atividade retiniana e melhorar o prognóstico visual).
- Ultra-sonografia (indicado em casos de opacificação dos meios transparentes).

As amostras de lente e cápsula anterior da lente foram obtidas de animais submetidos à facectomia intracapsular e extracapsular no Serviço de Oftalmologia do Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo. Para avaliação da concentração elementar por fluorescência de raios X, foram formados grupos, dentre eles, no grupo controle (GCO) foram obtidas lentes através da enucleação do bulbo

ocular de três cadáveres de cães sem raça definida (SRD) do mesmo hospital veterinário, e sem quaisquer alterações oculares, foram utilizados seis lentes, obtidos de seis olhos, sem catarata e sem diabetes mellitus, sendo um macho e duas fêmeas, com idades entre seis e nove anos. No grupo com diabetes mellitus (GDM) foram utilizadas 31 lentes com catarata diabética, sendo 26 fêmeas e cinco machos com idades entre seis e 14 anos.

Para análise da elasticidade da cápsula anterior da lente por microscopia de força atômica foram utilizadas quatro cápsulas para formar o grupo controle (GCO), que foram obtidas de dois cadáveres de cães do mesmo hospital veterinário, sem quaisquer alterações oculares, sem catarata e sem diabetes mellitus, sendo um macho e uma fêmea, com idade entre sete e oito anos. No grupo catarata (GCAT) foram coletadas 11 cápsulas através da capsulorexe de animais portadores de catarata submetidos à facectomia intracapsular, facectomia extracapsular e facoemulsificação, sendo nove fêmeas e dois machos com idades entre cinco e 15 anos.

Este estudo recebeu aprovação da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, o qual foi seguido todas as normas.

4.2 **Técnicas Experimentais**

4.2.1 Fluorescência de Raios X

A fluorescência de raios X (XRF) é uma técnica apropriada para avaliação dos elementos traço em diversos materiais biológicos, químicos ou geológicos (EKINCI; ASTAM; SAHIN, 2002). Em tecidos biológicos, através da fluorescência de raios X é possível determinar as alterações dos elementos de tecidos em estágios patológicos, em razão do caráter multielementar, alta sensibilidade, não destrutiva e rápida análise de forma simultânea (ZUCCHI et al., 2008).

Desde a década passada grande progresso tem sido feito para o melhor entendimento da transição intracelular do metabolismo dos íons metais. Embora muitos componentes relacionados com a hemostasia dos metais de transição têm sido amplamente estudados, o principal protagonista, os próprios metais catiônicos, tem recebido menos atenção (FAHRNI, 2007).

A capacidade analítica da fluorescência de raios X foi estabelecida em 1913, mas introduzida comercialmente no fim da segunda guerra mundial. A metodologia empregada tornou-se padrão em pesquisas na área científica e em laboratórios particulares (ADAMS; JANSSENS; SNIGIREV, 1998), sendo uma ferramenta útil para o estudo da distribuição elementar, em particular amostras biológicas (ANJOS et al., 2004).

A análise por fluorescência de raios X é um método quali-quantitativo baseado na medida das intensidades (número de raios X detectados por unidade de tempo) dos raios X característicos pelos elementos que constituem a amostra. Os raios X emitidos por tubos de raios X ou gama por uma fonte radioativa, excitam os elementos, os quais emitem linhas espectrais com energias características dos elementos e cujas intensidades estão relacionadas com a concentração do elemento na amostra (FILHO, 1999). A análise por fluorescência de raios X consiste em 3 fases: excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios X característicos emitidos pela amostra e detecção desses raios X (ZUCCHI et al., 2008).

Quando um elemento da amostra é excitado, este tende a ejetar os elétrons do interior dos níveis atômicos, como conseqüência disto, elétrons dos níveis mais afastados realizam um salto quântico para preencher a vacância. Cada transição eletrônica constitui uma perda de energia para o elétron, e esta energia é emitida na forma de fóton de raios X, de energia característica e bem definida para cada elemento (FILHO, 1999; FAHRNI, 2007).

Neste método a análise é baseada na excitação localizada de uma área microscopicamente pequena da superfície de uma amostra. A amostra é traduzida através de um feixe em movimento para aplicação da imagem. Há um número de vantagens intrínsecas da aplicação XRF como uma ferramenta microscópica. Em contraste com outros métodos de feixe, a alta energia de prótons pode penetrar profundamente abaixo da superfície do material fornecendo prontamente dados da composição química da maior parte da amostra, além de causar menos danos

radioativos ou térmicos comparado com outras técnicas, permitindo a análise não-destrutiva dos materiais mais sensíveis ou valiosos (ADAMS; JANSSENS; SNIGIREV, 1998).

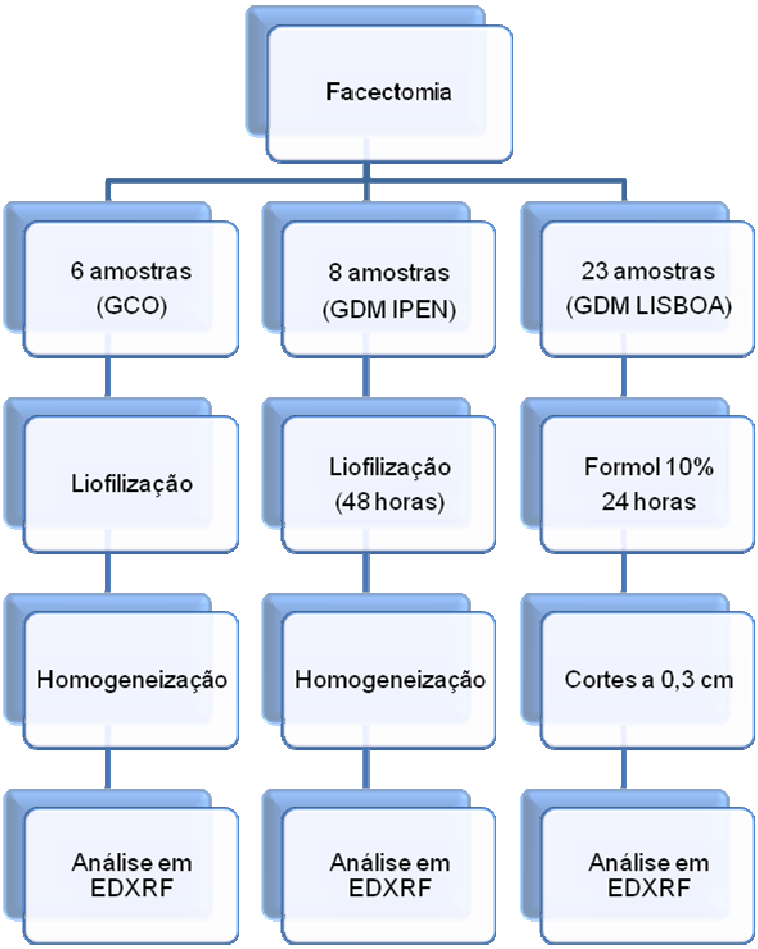
A fluorescência de raios X usando a radiação Síncrotron é uma técnica de análise multielementar. Este tipo radiação permite associar a espectrometria com a resolução espacial em escala micrométrica, alta eficiência para determinação de elementos traço em curto espaço de tempo (ANJOS et al., 2004), e baixo limite de detecção (µg g^{-1}) (BOHIC et al., 2001). A radiação Síncrotron é a radiação eletromagnética emitida por partículas aceleradas carregadas em direção ao centro de uma órbita circular. Estas partículas ao mudarem sua direção através de dipolos magnéticos, emitem uma intensa radiação eletromagnética, de alto brilho espectral, denominada radiação Síncrotron, e vem sendo utilizada no mapeamento elementar em amostras biológicas (SERPA, 2007).

Inúmeras técnicas são utilizadas para avaliação dos elementos traço em tecidos biológicos, entre eles, a fluorescência de raios X produzida pela radiação Síncrotron oferece uma excelente ferramenta para a análise dos elementos traço com alta sensibilidade devida suas propriedades como, alto brilho, alta polarização linear, colimação inerente do feixe e larga faixa de energia espectral o qual pode ser gerada em tubos para aperfeiçoar a fluorescência dos elementos selecionados por meio de um monocromator apropriado, resultando em melhor poder de detecção. Em adição, uma simples preparação e análise da amostra, principalmente em pequenas amostras, fazem desta técnica particularmente apropriada para amostras de tecidos sadios e em estágios patológicos (SILVA et al., 2009).

A fluorescência de raios X possui alta aplicabilidade para materiais biológicos e tem sido utilizado de maneira crescente, o que pode ser verificado em estudos com bactérias, protistas aquáticos, os quais possuem habilidade de acumular elementos do ambiente. Doenças neuro-degenerativas são também foco de estudos dos elementos traço, em que o imbalanço de alguns elementos predispõe a desordens neurológicas (FAHRNI, 2007). Em tecidos oculares, esta técnica se mostrou particularmente apropriada para investigação da concentração dos elementos traço, por possuir simplicidade na preparação da amostra, precisão e rapidez na detecção dos elementos (GALIN; NANO; HALL, 1962; EKINCI; ASTAM; SAHIN, 2002).

4.2.1.1 Preparação e Análise pela Fluorescência de raios X por Dispersão de Energia (EDXRF)

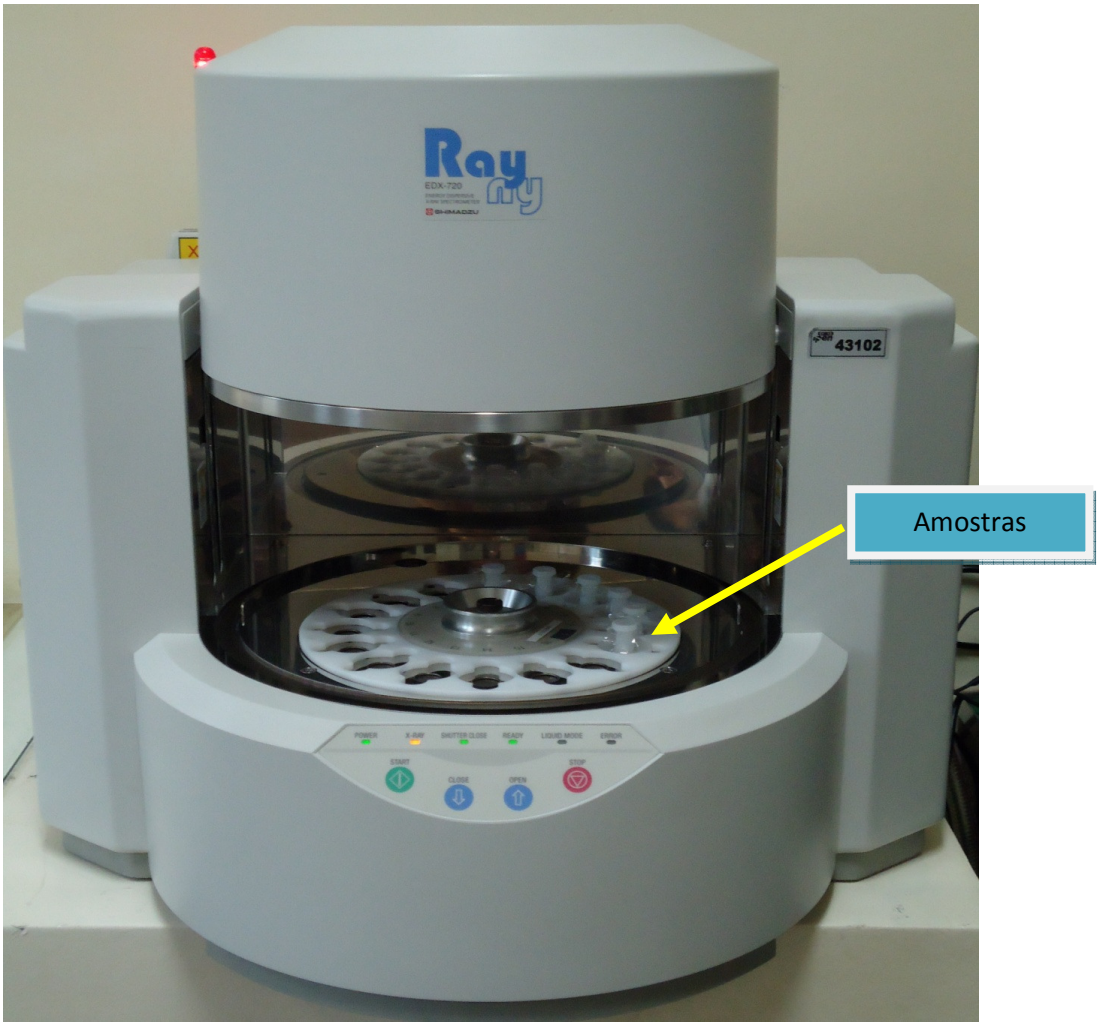
Nesta etapa do trabalho, as amostras coletadas de catarata diabética foram separadas em dois grupos distintos para análise quantitativa de cálcio, ferro, cobre e zinco por fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) em dois laboratórios. No Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo, Brasil, foram analisadas a concentração total de 8 amostras de catarata diabética, e no Centro de Física Atômica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal, foram analisadas a concentração relativa de 23 amostras de catarata diabética. A análise do grupo controle (GCO) foi realizada no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo, Brasil. O fluxograma 1 sintetiza, no geral, o processamento das amostras para análise por EDXRF.



Fluxograma 1 – Esquema de preparação das amostras para EDXRF

As medidas quantitativas do primeiro grupo com oito amostras de lente com catarata, e do grupo controle com seis amostras de lentes normais foram realizadas com o equipamento de EDXRF do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo, Brasil (Figura 2). O equipamento consiste de um tubo de raios X equipado com ródio que atua como um transmissor de raios X e permite uma excelente penetração na amostra. As características das radiações emitidas pelo elemento da amostra foram obtidas por um detector de silício lítico. A precisão das medidas foi verificada através da concentração elementar em uma amostra certificada de fígado de bovino (NIST 1577b) conforme anexo A. O gerador de raios X foi operado a 50 kV e 100 mA e o tempo de aquisição típico para cada elemento foi de 100 segundos.

O segundo grupo composto por 23 amostras de lentes com catarata foram analisadas no Centro de Física Atômica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal, para a realização das medidas quantitativas. Os espectros foram obtidos utilizando um espectrômetro de raios X por dispersão de energia com um alvo secundário equipado com molibdênio. O valor da tensão aplicada ao tubo de raios X foi de 50 kV e a corrente foi de 20 mA. Neste sistema a radiação foi detectada através de detector de silício lítico cuja área ativa corresponde a 30 mm^2 e uma janela de berílio de 8 µm e o tempo de aquisição correspondeu a 1000s.

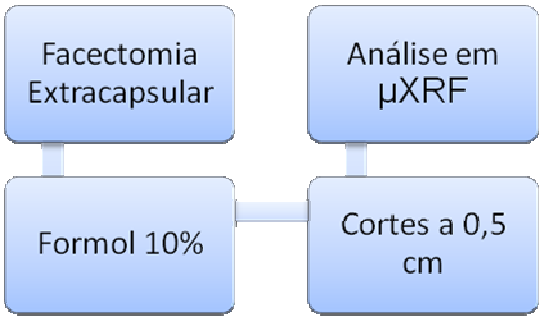


Fonte: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) – USP

Figura 2 – Equipamento de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (EDXRF)

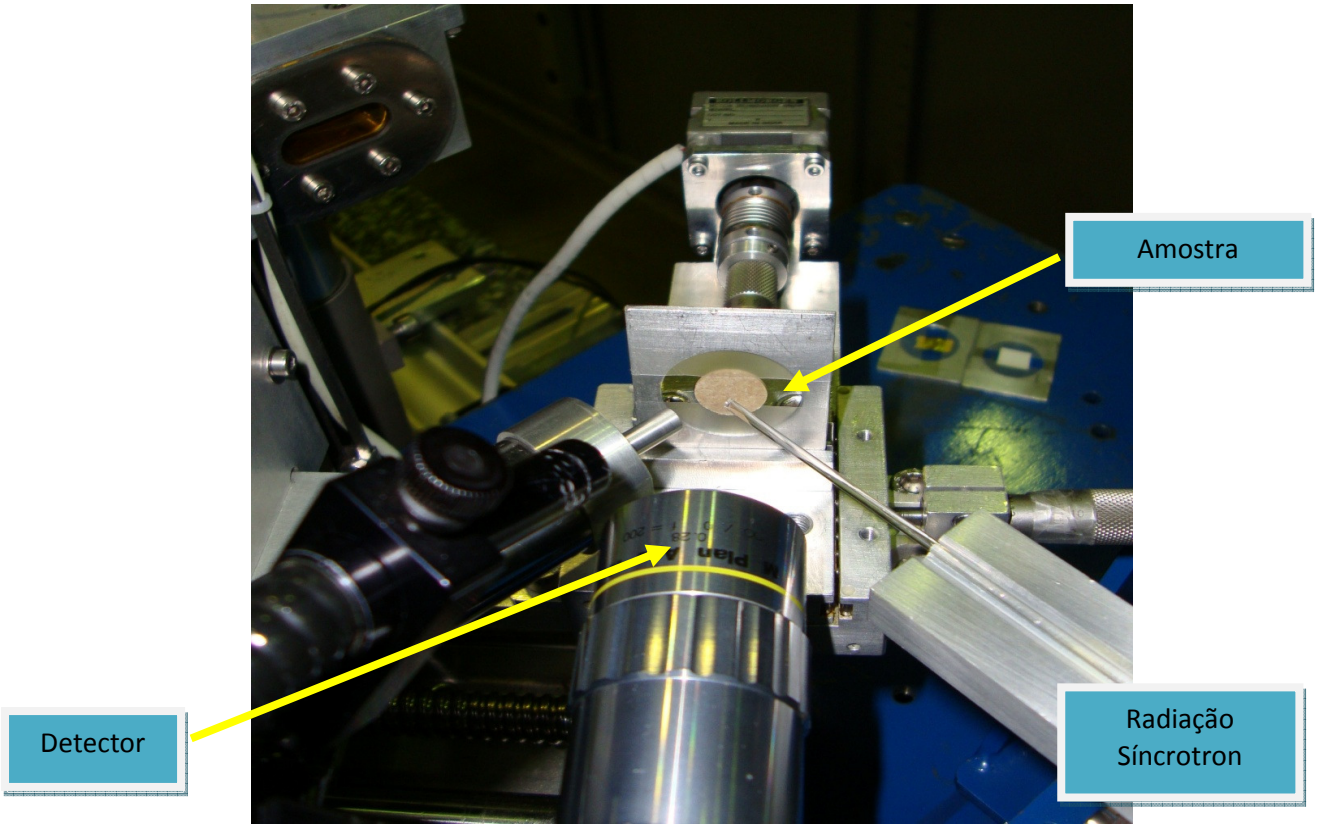
4.2.1.2 Preparação e Análise pela Microfluorescência de raios X (µXRF)

Para análise qualitativa de elementos químicos (ferro, cobre e zinco) foi realizado através de mapas de distribuição dos elementos químicos em amostras de lentes normais e em amostras de catarata diabética por microfluorescência de raios X (µXRF). O processo de coleta e análise foi realizado como descrito no fluxograma 2.



Fluxograma 2 – Esquema de preparação das amostras para µXRF

Os mapas da composição química foram obtidos durante o experimento realizado na linha de luz (D09B-XRF-8787/Projeto 2686) no Laboratório Nacional de Luz Síncontron – LNLS (Campinas, São Paulo, Brasil). A excitação dos raios X característicos foram obtidos com um detector com HPGe com uma resolução de 140 eV a 5.9 keV. As amostras foram posicionadas no plano de imagem de 0,5 µm com os três eixos (X, Y, Z) controlados por motor de passo. Um vídeo foi instalado ao microscópio (magnificação de 500x) e usado para posicionar precisamente a amostra no feixe. O suporte é posicionado a 45° em relação ao detector e ao feixe incidente, em um posicionamento também conhecido como geometria 45°/45°. Desta forma, pixels de 100 µm x 100 µm foi obtido mantendo alto fluxo de fótons na amostra. As radiações características emitidas pelos elementos da amostra foram coletadas pelo detector. Parâmetros experimentais foram obtidos pela calibração através de material padrão. Na figura 3 visualiza-se o arranjo experimental indicando o local onde a amostra é posicionada, o feixe incidente sobre a amostra e o detector.



Fonte: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)

Figura 3 – Arranjo experimental para as medidas pela Microfluorescência de Raios X (µXRF)

4.2.2 Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica (MFA) tem sido estabelecida como uma técnica de alta resolução que permite proporcionar informações reais de estruturas celulares e biológicas (ANTUNES et al., 2007a). Comparada com a microscopia eletrônica, a MFA possui a habilidade de obter imagens topográficas da superfície de amostras aquosas, não aquosas, ou de material a seco (ANTUNES et al., 2007a; YAMAMOTO et al., 2002; TSILIMBARIS et al., 2000).

Por muitos anos os pesquisadores tentaram conciliar a alta resolução da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão com a capacidade de se obter imagens em meio aquoso, próprio dos microscópios ópticos. Com a introdução da técnica conhecida como microscopia de tunelamento ("Scanning Tunneling

Microscopy – STM”) em 1981, surgiram às técnicas nanométricas. Em 1986 foi criado a MFA que pode produzir imagens de superfícies condutoras e não condutoras, diferentemente da microscopia de tunelamento que pode produzir imagens de superfície que conduzem elétrons. Estas técnicas (STM e MFA) e seus diversos modos de operação constituem uma nova classe de instrumentos pertencentes ao grupo de microscopias chamado de microscopia de varredura por sonda mecânica (“Scanning Probe Microscope – SPM”) (FERREIRA; YAMANAKA, 2006).

O princípio de funcionamento do MFA é relativamente simples, baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta piramidal (ponteira) de alguns micras de comprimento (100 a 200 µm) e geralmente com menos de vinte nanômetros de diâmetro, integrada em um cantilever flexível (FOTIADIS et al., 2002; FERREIRA; YAMANAKA, 2006). A força entre a ponta e a superfície da amostra faz com que o cantilever se aproxime ou se afaste e essa deflexão é proporcional à força de interação (FERREIRA; YAMANAKA, 2006). As deflexões causadas pela interação sonda-amostra são detectadas por um detector óptico (FOTIADIS et al., 2002).

Á medida que a ponta varre, ou a amostra é deslocada sob a ponta, os diferentes tipos de “acidentes geográficos” encontrados sobre a superfície fazem com que a interação mude. As variações das interações são os fatores que provocam diferentes deflexões (FERREIRA; YAMANAKA, 2006). O resultado é uma imagem em relevo tri-dimensional em alta resolução que reflete a interação entre a sonda e a amostra (TSILIMBARIS et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2002).

Em sistemas biológicos incluindo células, bactérias, vírus e biomoléculas, esta técnica possibilita a compreensão dos fenômenos biofísicos e bioquímicos envolvidos, constituindo-se em mais uma ferramenta auxiliar de análise e proporcionando um rápido desenvolvimento interdisciplinar (FERREIRA; YAMANAKA, 2006).

Diversas amostras biológicas podem ser analisadas com o uso da MFA, dentre elas, moléculas individuais como DNA, proteínas, uma variedade de membranas e células vivas (TSILIMBARIS et al., 2000), seu uso também pode ser aplicado em amostra de origem fibrosa como queratina e colágeno (ANTUNES et al., 2007b). Outra característica única da MFA é a habilidade de mensurar várias propriedades micromecânicas das amostras, como superfície de fricção, elasticidade

e viscosidade (TSILIMBARIS et al., 2000) em alta resolução, em adição permite avaliar amostras biológicas em seu estado original (ANTUNES et al., 2007a).

A microscopia de força Atômica (MFA) vem provando seu valor não somente para análise de estruturas topográficas de amostras biológicas, mas também em pesquisa de propriedades inerentes das estruturas biológicas, como forças de interação local, propriedades mecânicas ou dinâmicas em um ambiente natural, ou seja, fisiológico (VINCKIER; SEMENZA, 1998).

A MFA permite avaliação das propriedades elásticas de células, proteínas e tecidos moles de maneira não traumática e precisa. Na área oftalmológica, o interesse no estudo sobre o decréscimo da elasticidade da lente com o avanço da idade, tem sido investigado através de inúmeros métodos analíticos, a exemplo da técnica de estiramento uniaxial e análise dinâmica mecânica. Em relação à técnica de estiramento uniaxial não é possível se obter valores absolutos, entretanto a técnica de análise dinâmica mecânica é possível se obter valores absolutos, porém necessitam de bastante atenção em relação à calibração do equipamento e preparação da amostra (ZIEBARTH et al., 2007).

Para a determinação das propriedades elásticas em amostras biológicas, o cantilever serve como um nanoindentador flexível permitindo analisar pequenas amostras biológicas, como células e tecidos. Para cálculo do parâmetro de interesse vários modelos são utilizados, contudo, o modelo de Hertz é o mais utilizado. Esta metodologia é amplamente utilizada na biologia, sendo também multidisciplinar, descrevendo as propriedades elásticas de diferentes matrizes e materiais (NEUMANN, 2010).

A elasticidade de um objeto macroscópico pode ser descrito pela lei de Hooke em termos de pressão e tensão. A pressão é a quantidade igual à força de deformação e a tensão representa a quantidade da deformação. A lei de Hooke prova que a relação pressão/tensão é uma constante dependendo do material e da deformação. Esta constante é o módulo elástico e é específico para o material analisado (VINCKIER; SEMENZA, 1998).

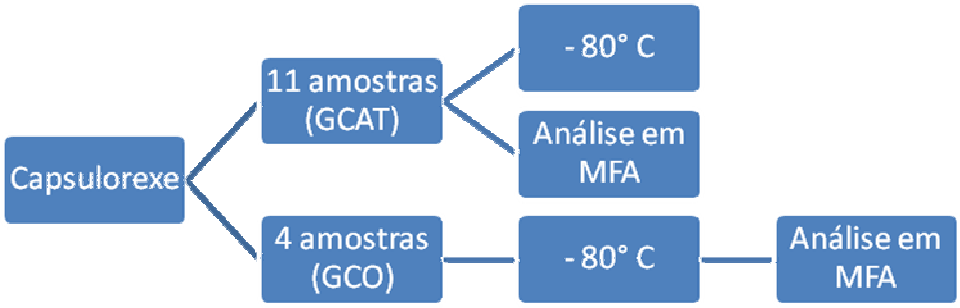
O módulo elástico, também conhecido como módulo de Young, o qual é a resistência mecânica do material enquanto ocorre o alongamento ou compressão. O módulo elástico tem dimensão de força por superfície de área. Contanto que a relação pressão/tensão seja linear, a deformação do material é elástica, e o material

sempre retorna a sua forma original se nenhuma força é aplicada (VINCKIER; SEMENZA, 1998).

A compreensão das mudanças na elasticidade para distintos graus de lesão poderão auxiliar no desenvolvimento de sistemas de dimensões reduzidas mais eficazes e não invasivos para obtenção dessa quantidade física de maneira imediata.

4.2.2.1 Preparação das Amostras e Análise por Microscopia de Força Atômica

Para observação através de MFA foi utilizada cápsulas anterior de lente de cães portadores de catarata (GCAT) e não portadores de catarata (GCO) sem prévia preparação química. O processamento das amostras para análise por MFA se fez como descrito no fluxograma 3.



Fluxograma 3 – Esquema de preparação das amostras para MFA

Cada amostra foi aderida a uma lamínula 20x20 mm com o auxílio de cola para sutura composta por n-Butil Cianoacrialato (Vetbond®, 3M, USA). A análise foi realizada em célula líquida, sendo a amostra totalmente imersa em solução salina balanceada com intuito de prevenir alterações decorrentes da desidratação.

A análise das curvas de elasticidade foi feitas através do programa de computador que acompanha o equipamento. Cada amostra de cápsula anterior da lente foi mensurada 10 vezes em diferentes locais como demonstrado na figura 4.

As curvas de força versus distância foram obtidas com um microscópio de varredura por sonda (Agilent Technologies), modelo Pico SPM I da Molecular Imaging (Tempe, AZ, USA) acoplado ao controlador Pico Scan 2100 (Figura 5). As curvas de força versus distância foram obtidas operando no modo de MFA de contato com cantilevers MAClevers tipo II. O substrato de referência utilizado foi uma lamínula de microscopia óptica. Ao iniciar das medidas, a curva de referência da solução salinada balanceada foi calculada. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

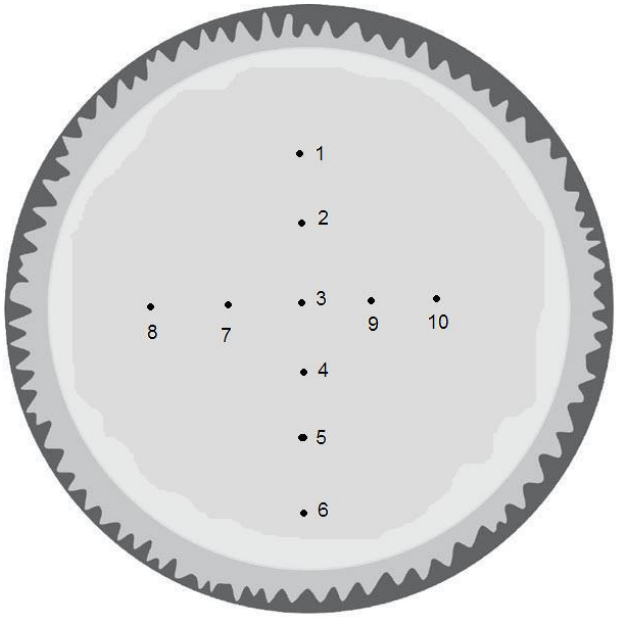
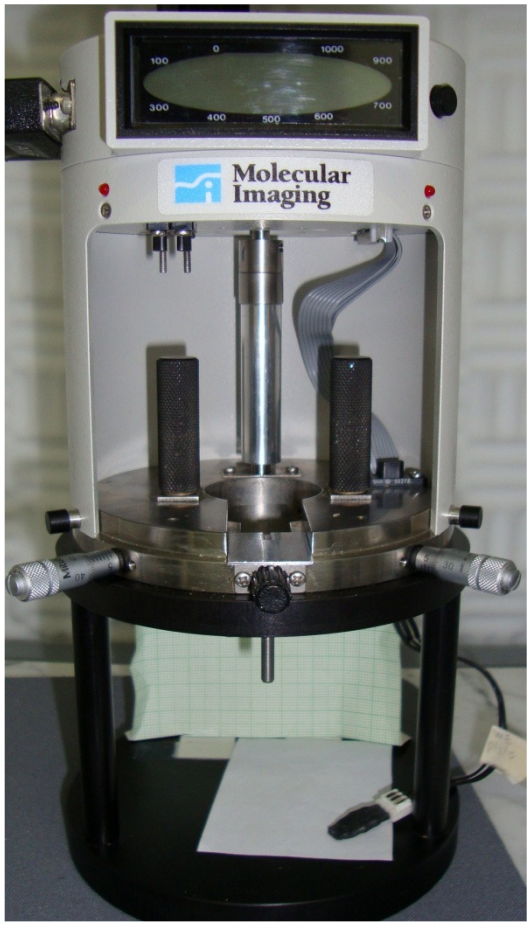


Figura 4 – Apresentação dos locais utilizados para as medidas de elasticidade pela Microscopia de Força Atômica



Fonte: Instituto de Química – USP

Figura 5 – Microscópio de Força Atômica (modelo PicoSPM I), utilizado para as medidas de elasticidade

O módulo de Young foi extraído a partir de uma curva de força para uma dada posição. O procedimento requer a execução de vários passos de certa complexidade. Anteriormente à determinação da curva de força obtém-se uma imagem topográfica das amostras no modo contato. O passo seguinte consiste em adquirir a curva de força para a amostra de referência que representará o branco nas medidas. Adquirem-se as curvas de força para a amostra para um número representativo de pontos. Todas as curvas são exportadas no formato ASCII para processamento e análise de dados.

O processamento de dados requer a visualização da curva de deflexão pela posição do piezoelétrico. Da curva de força adquirida extraímos apenas parte dela desconsiderando os efeitos de adesão que possam ocorrer.

O procedimento seguinte consiste em separar parte da curva da biomembrana e da referência e deslocá-la para o ponto (0,0). Deve-se também verificar se o ponto final das duas curvas é o mesmo.

Para os cálculos necessita-se obter o valor da sensibilidade através da amostra de referência que é dado por: $S = \Delta Y / \Delta X$. A força é determinada pela equação $F = K.S$ na qual *K* corresponde a constante da mola que no experimento correspondeu a 2.8 N/m. O valor de ΔD =-ΔZ na qual ΔD refere-se a deflexão em nanôampere e ΔZ corresponde a indentação cuja unidade corresponde a nanômetros.

A obtenção do ajuste da curva (*fitting*) para os dados nesse ponto é efetivada. A equação usada corresponde a $Y = a.x^b$.

O modelo de Hertz assume que a indentação para ser negligenciável em comparação a espessura da amostra, a profundidade de indentação deve ser otimizada. O modelo de Hertz é válido para pequenas indentações, com valores entre 200 e 500 nm (SALERNO; BYKOV, 2006).

A elasticidade é determinada pela relação, na qual a corresponde a um parâmetro extraído do ajuste da curva para os dados numéricos:

$$E(MPa) = \frac{6.82}{a^{\frac{3}{2}}}$$

4.3 **Análise Estatística**

Realizamos todos os testes estatísticos na linguagem R (versão 2.0, R Core Team, 2010), e por meio do programa estatístico Origin (versão 6.0, Microcal Software, Northampton, MA, EUA).

Inicialmente foram realizadas comparações dos dados obtidos por fluorescência de raios X por meio do teste ANOVA. Encontrando diferença significativa, realizamos o teste *pos hoc* honesto de diferenças significativas de Turkey (Turkey´s Honestly Significant Difference – HSD). Para os testes admitimos o nível de significância de 5% (α= 0,05).

Para análise de elasticidade obtida pela microscopia de força atômica, foi utilizado o teste t de Student. O nível de significância estabelecido foi 5% ($p<0,05$).

Com a proposta de compreender o comportamento dos elementos cálcio, ferro, cobre e zinco, em amostra de lentes normais e compará-las com amostras de catarata diabética, foi realizada análise topográfica dos elementos através de mapas bidimensionais por meio do programa Origin (versão 6.0, Microcal Software, Northampton, MA, EUA).

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos nos dois grupos: Controle (GCO), Grupos dos diabéticos (IPEN e LISBOA) estão apresentados na tabelas 1 a 5.

A idade dos animais variou entre seis a 14 anos. No grupo controle, a idade variou entre seis a nove anos. No grupo dos diabéticos (GDM IPEN), a média de idade era de 9,9 anos, com desvio padrão de 2,6 anos e mediana de 9,5 anos; no grupo dos diabéticos (GDM LISBOA), a média de idade era 10,6 anos, com desvio padrão de 2,0 anos e mediana de 11 anos.

A duração da diabetes mellitus variou entre zero a 42 meses. No grupo dos diabéticos (GDM IPEN), a média de duração da doença era de 7,6 meses, com desvio padrão de 7,4 meses e mediana de seis meses. No grupo dos diabéticos (GDM IPEN), a média de duração da doença era de 9,4 meses, com desvio padrão de 10,9 meses e mediana de sete meses.

A glicemia variou entre 58 mg/dl a 402 mg/dl. No grupo dos diabéticos (GDM IPEN), a média da glicemia era de 185,4 mg/dl, com desvio padrão de 74,8 mg/dl e mediana de 174,0 mg/dl. No grupo dos diabéticos (GDM LISBOA), a média da glicemia era de 198,4 mg/dl, com desvio padrão de 107,0 mg/dl e mediana de 166,0 mg/dl.

5.1 **Análise Quantitativa por EDXRF**

A concentração elementar pela fluorescência de raios X nas amostras de catarata diabética foi obtida através dos espectros característicos para cada elemento químico. A média, desvio padrão e mediana dos elementos analisados no GCO, GDM IPEN e GDM LISBOA estão apresentados nas tabelas 3 a 5.

A concentração de cálcio encontrada é apresentada no gráfico 1, diferiu significativamente entre os grupos controle e catarata diabética de ambos os laboratórios ($F_{2,33}$= 195.22, α<0.0001). No teste *pos hoc* Tukey´s HSD, o GCO diferiu do GDM IPEN (diff= 184.588 ± 41.146, α<0.0001) e do GDM Lisboa (diff= -72.217 ±

33.903, α<0.0001). Os grupos GDM IPEN e GDM Lisboa também diferiram entre si (diff= 256.805 ± 31.924, α<0.0001).

A concentração de ferro encontrada é apresentada no gráfico 2. Houve diferença significante entre os grupos controle e o grupo catarata diabética de ambos os laboratórios ($F_{2,33}$= 6.97, α<0.0001). No teste *pos hoc* Tukey´s HSD, o GCO não diferiu do GDM IPEN (diff= -1.844 ± 3.664, α= 0.44), mas diferiu do GDM Lisboa (diff= -4.275 ± 3.019, α=0.004). Os grupos GDM IPEN e GDM Lisboa não diferiram entre si (diff= -2.431 ± 2.843, α= 0.106).

A concentração de cobre encontrada é apresentada no gráfico 3. A concentração de cobre diferiu significativamente entre os grupos controle e o grupo catarata diabética de ambos os laboratórios ($F_{2,33}$= 1059.0, α<0.0001). No teste *pos hoc* Tukey´s HSD, o GCO diferiu do GDM IPEN (diff= -4.638 ± 1.885, α<0.0001), e com GDM Lisboa (diff= -24.356 ± 1.553, α<0.0001). Os grupos GDM IPEN e GDM Lisboa também diferiram entre si (diff= 19.717 ± 1.462, α<0.0001).

A concentração de zinco encontrada é apresentada no Gráfico 4. Não houve diferença significativa entre todos os grupos ($F_{2,33}$= 0.383, α= 0.6844).

Tabela 1 – Raça, sexo, idade, tempo de progressão da diabetes mellitus e glicemia dos animais diabéticos, dos quais foram coletadas as amostras de catarata diabéticas e analisadas no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo – 2009

Cão	Raça	Sexo	Idade (anos)	Tempo DM (meses)	Glicemia (mg/dl)
1	SRD	F	12	10	169,0
2	SRD	F	8	4	109,0
3	Labrador	M	9	8	168,0
4	Poodle	F	14	2	287,0
5	Pinscher	M	12	9	70,0
6	ChowChow	F	7	1	233,0
7	Poodle	F	7	24	268,0
8	SRD	M	10	3	179,0
Média			**9.9**	**7.6**	**185.4**
DP			2.6	7.4	74.8
Mediana			9.5	6	174,0
Mínimo			7	1	70,0
Máximo			14	24	287,0

DP= Desvio Padrão
SRD= Sem Raça Definida

Tabela 2 – Raça, sexo, idade, tempo de progressão da diabetes mellitus e glicemia dos animais diabéticos, dos quais foram coletadas as amostras de catarata diabéticas e analisadas no Centro de Física Atômica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal – 2009

Cão	Raça	Sexo	Idade (anos)	Tempo DM (meses)	Glicemia (mg/dl)
1	Poodle	F	13	3	363,0
2	SRD	F	10	3	250,0
3	SRD	F	13	7	66,0
4	Dachshund	F	9	24	142,0
5	Poodle	F	12	5	208,0
6	SRD	F	8	0	149,0
7	Dachshund	M	11	7	148,0
8	P. Belga	F	11	5	195,0
9	Fox P	F	13	5	75,0
10	SRD	F	12	8	267,0
11	Poodle	F	10	2	87,0
12	SRD	F	11	10	152,0
13	Pinscher	F	6	0	402,0
14	Poodle	F	9	18	380,0
15	Poodle	F	13	36	135,0
16	SRD	F	11	2	265,0
17	Poodle	F	7	1	395,0
18	SRD	F	9	7	120,0
19	SRD	F	13	7	166,0
20	SRD	F	13	42	225,0
21	P. Alemão	M	9	4	228,0
22	Fox Paul.	F	10	8	88,0
23	Dalmata	F	11	12	58,0
Média			**10.6**	**9.4**	**198.4**
DP			2.04	10.9	107.0
Mediana			11	7	166,0
Mínimo			6	0	58,0
Máximo			13	42	402,0

DP= Desvio Padrão
SRD= Sem Raça Definida

Tabela 3 – Concentração elementar das amostras de lentes normais do grupo controle (GCO) analisadas no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo – 2010

Amostra	Cálcio ($\mu g\ g^{-1}$)	Ferro ($\mu g\ g^{-1}$)	Cobre ($\mu g\ g^{-1}$)	Zinco ($\mu g\ g^{-1}$)
1	64,54	11,50	26,43	43,31
2	51,89	13,82	28,91	43,60
3	97,75	8,98	25,15	19,86
4	219,82	8,95	25,33	43,76
5	127,75	13,13	27,45	41,78
6	63,63	11,30	28,42	31,29
Média	**104,23**	**11,3**	**26,95**	**37,3**
DP	63,12	2,03	1,574	9,78
Mediana	81,14	11,4	26,94	42,5
Mínimo	51,89	8,95	25,15	19,9
Máximo	219,82	13,82	28,91	43,8

DP= Desvio Padrão

Tabela 4 – Concentração elementar das amostras de catarata diabética analisadas no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo – 2009

Amostra	Cálcio ($\mu g\ g^{-1}$)	Ferro ($\mu g\ g^{-1}$)	Cobre ($\mu g\ g^{-1}$)	Zinco ($\mu g\ g^{-1}$)
1	263,33	6,36	22,25	39,04
2	284,11	9,36	20,79	32,54
3	280,81	6,42	20,64	40,24
4	282,09	9,97	24,79	39,28
5	307,34	9,86	23,93	40,22
6	1763,67	15,54	20,73	35,29
7	364,42	7,45	20,53	41,82
8	239,63	16,63	23,24	36,60
Média	**473,18**	**10,2**	**22,11**	**38,1**
DP	522,71	3,92	1,69	3,08
Mediana	283,1	9,61	21,52	39,2
Mínimo	239,63	6,36	20,53	32,5
Máximo	1763,7	16,6	24,79	41,8

DP= Desvio Padrão

Tabela 5 – Concentração elementar das amostras de catarata diabética analisadas no Centro de Física Atômica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal – 2009

Amostra	Cálcio ($\mu g\ g^{-1}$)	Ferro ($\mu g\ g^{-1}$)	Cobre ($\mu g\ g^{-1}$)	Zinco ($\mu g\ g^{-1}$)
1	30,15	6,10	1,84	43,19
2	28,04	10,08	2,13	37,22
3	26,84	3,30	1,04	31,44
4	28,52	5,09	1,62	29,60
5	38,97	4,20	2,45	33,31
6	46,33	4,55	1,91	43,25
7	25,82	5,87	2,88	41,13
8	34,26	5,52	4,14	61,93
9	42,43	8,76	2,14	39,82
10	34,61	7,85	3,04	55,45
11	35,48	3,56	1,42	32,59
12	26,45	10,66	6,18	61,35
13	24,86	6,52	4,08	44,73
14	29,92	4,37	1,55	37,17
15	34,20	5,05	2,04	32,63
16	27,01	13,14	4,02	5,61
17	25,62	6,67	3,90	47,59
18	31,51	8,84	1,80	32,41
19	27,60	7,73	1,86	48,86
20	41,91	10,45	3,59	98,58
21	29,22	8,78	2,43	50,10
22	37,20	7,58	1,85	34,82
23	29,35	6,44	1,71	30,32
Média	**32,01**	**7,0**	**2,592**	**42,3**
DP	6,026	2,54	1,218	17,2
Mediana	29,92	6,52	2,13	39,8
Mínimo	24,86	3,3	1,04	5,61
Máximo	46,33	13,1	6,18	98,6

DP= Desvio Padrão

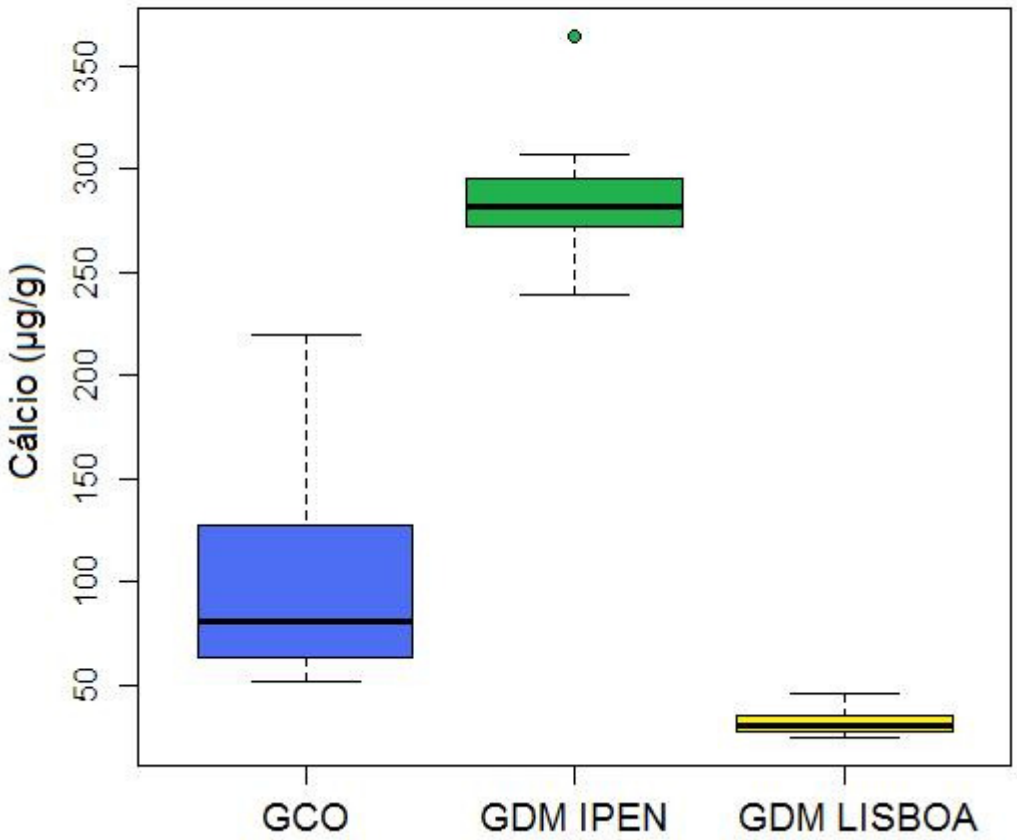


Gráfico 1 – Representação gráfica (Boxplot) com os valores das concentrações de cálcio para os grupos controle (GCO), grupo dos diabéticos IPEN e Lisboa (GDM IPEN e GDM LISBOA)

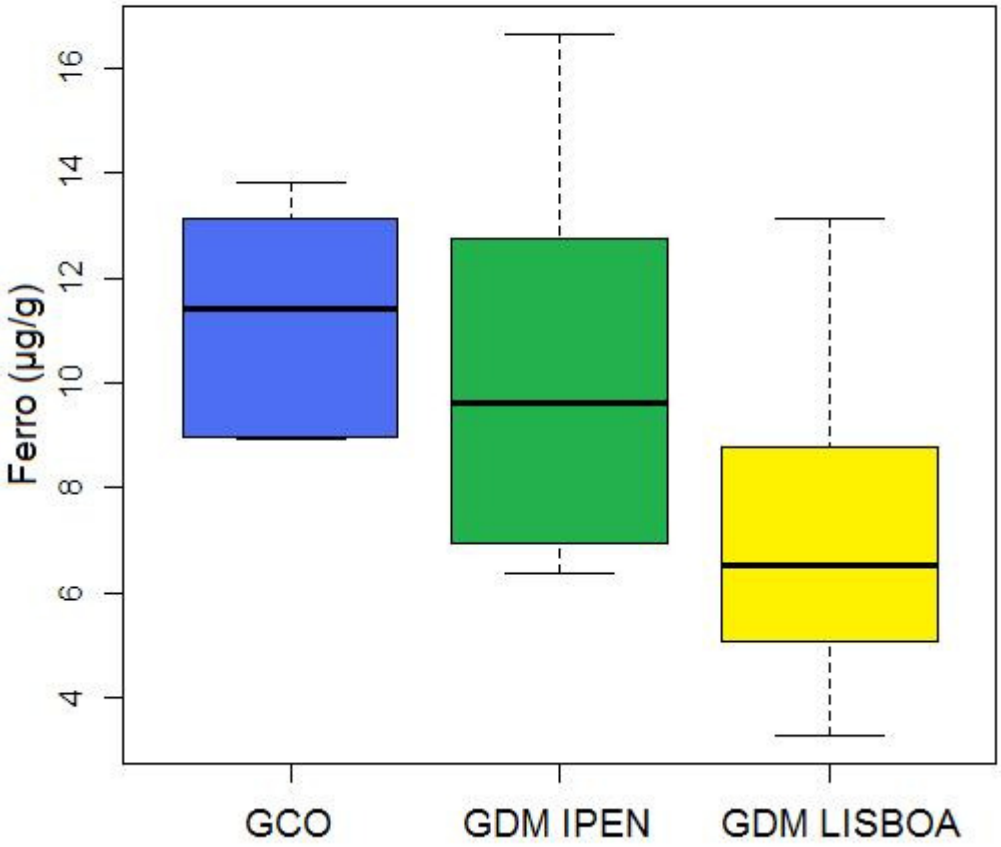


Gráfico 2 – Representação gráfica (Boxplot) com os valores das concentrações de ferro para os grupos controle (GCO), grupo dos diabéticos IPEN e Lisboa (GDM IPEN e GDM LISBOA)

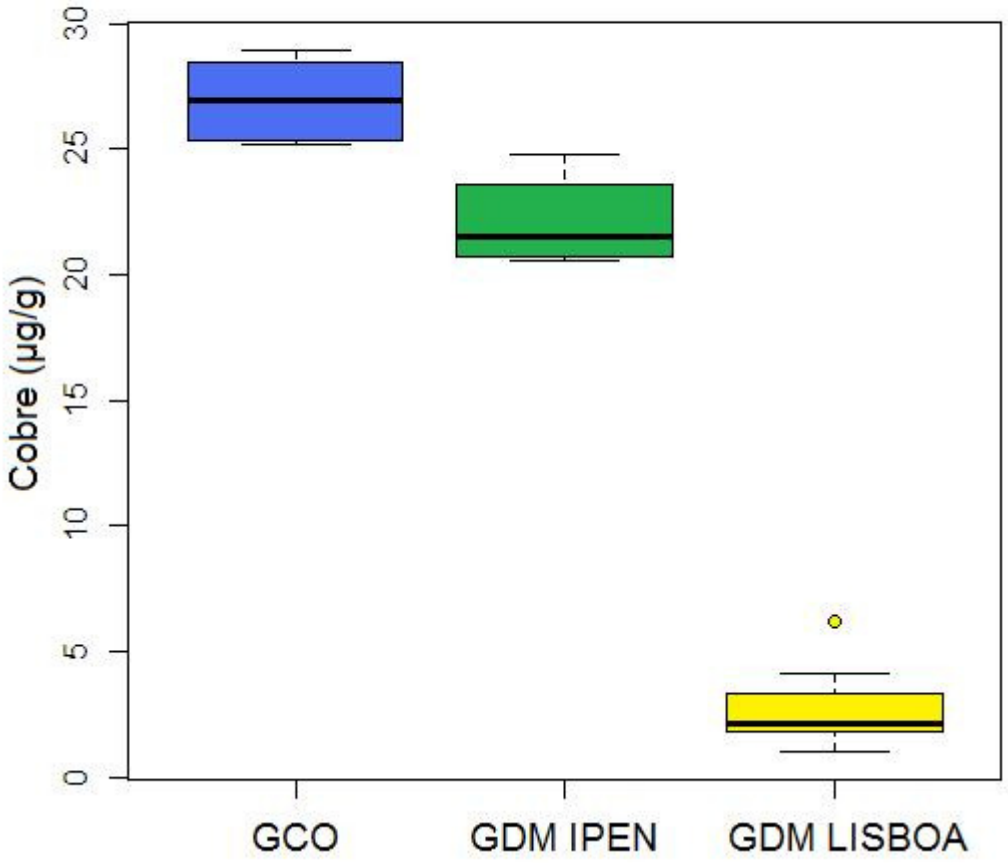


Gráfico 3 – Representação gráfica (Boxplot) com os valores das concentrações de cobre para os grupos controle (GCO), grupo dos diabéticos IPEN e Lisboa (GDM IPEN e GDM LISBOA)

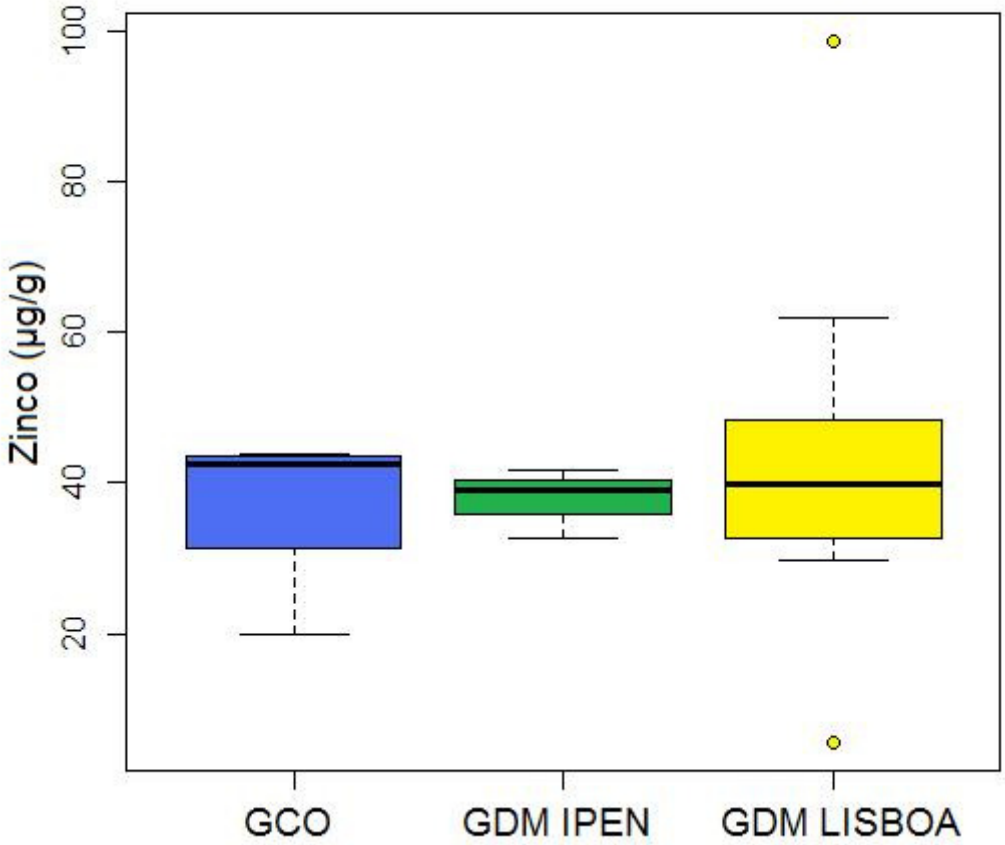


Gráfico 4 – Representação gráfica (Boxplot) com os valores das concentrações de zinco para os grupos controle (GCO), grupo dos diabéticos IPEN e Lisboa (GDM IPEN e GDM LISBOA)

5.2 **Mapeamento Bidimensional da Concentração Elementar por µXRF**

A microfluorescência de raios X é uma técnica multielementar na qual todos os elementos químicos são adquiridos simultanemante. Os mapas de distribuição química para os elementos traço ferro, cobre e zinco presentes nas amostras de lentes normais e amostras de catarata diabética são apresentados nas figuras de 6 a 11. Neste experimento foram analisadas nove amostras, sendo que as amostras de catarata diabética apresentaram alterações na concentração quando comparadas com amostras de lentes normais. Para análise dos elementos químicos nos mapas de distribuição, inserimos a informação química na região cortical (c) e nuclear (n), visando estabelecer indicativos de modificação na lente segundo definições existentes na literatura. Para cada ponto um espectro de fluorescência de raios X foi mensurado. As escalas de cores apresentadas em todos os mapas bidimensionais correspondem aos valores de intensidade (contagem por segundo) e a cor vermelha corresponde maior intensidade do elemento na amostra. Os eixos x e y correspondem à extensão da amostra avaliada em milímetros.

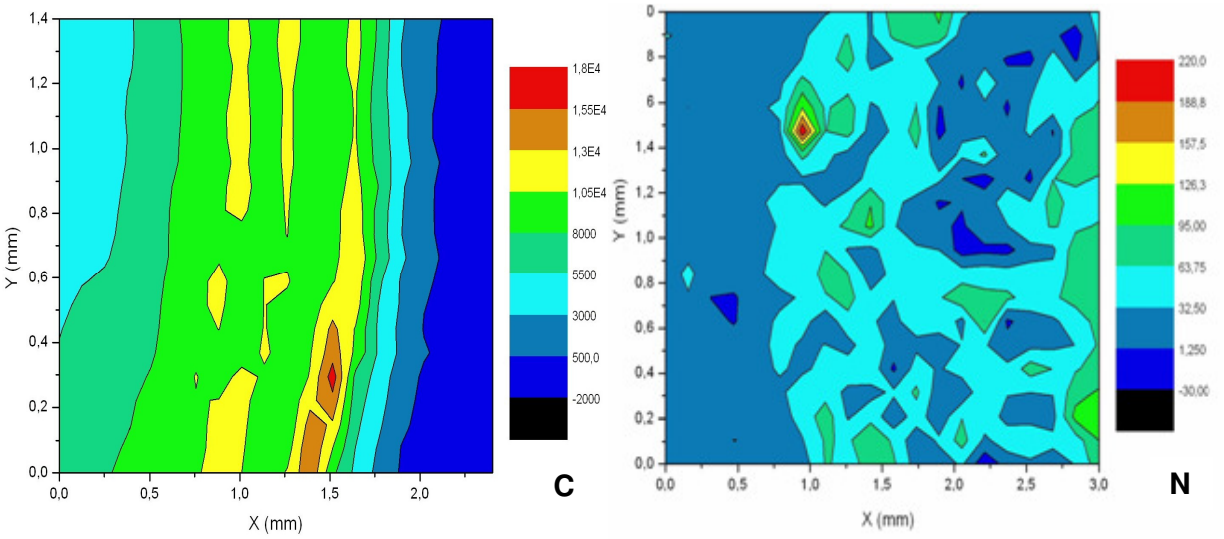


Figura 6 – Mapeamento bidimensional da concentração elementar de ferro em amostra de lentes normais

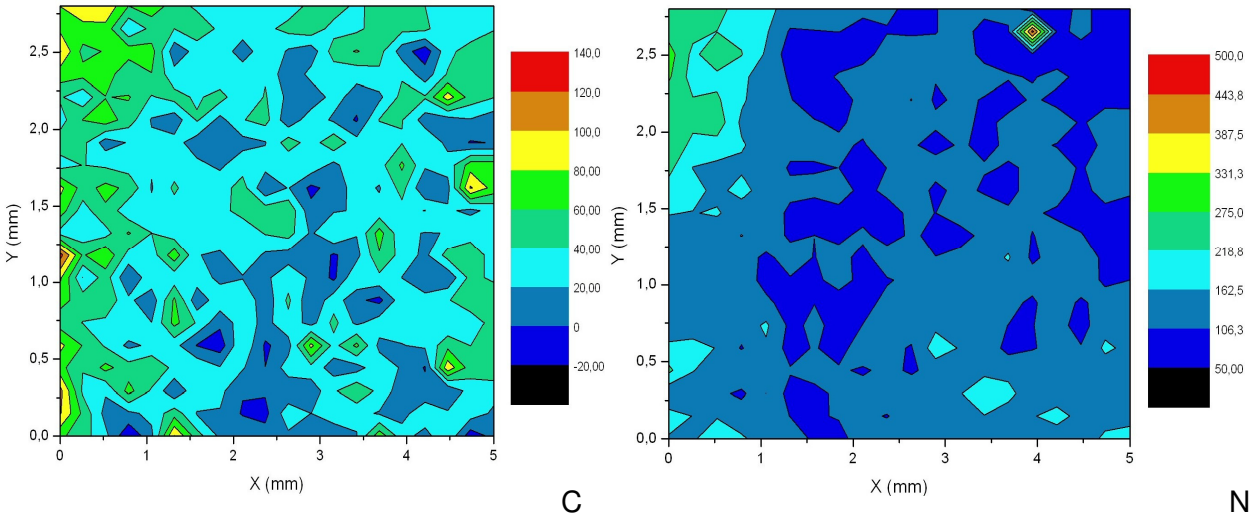


Figura 7 – Mapeamento bidimensional da concentração elementar de ferro em amostra de catarata diabética

Nas figuras 6 e 7 observamos que a distribuição do Fe apresentou leve perda de homogeneidade na catarata diabética quando comparada a lente normal. Quanto à concentração verificamos que houve uma diminuição na região nuclear, mas em contrapartida, observamos um aumento em outro ponto analisado na região nuclear, porém, foi possível notar que tal região analisada está em contato com a zona equatorial da amostra.

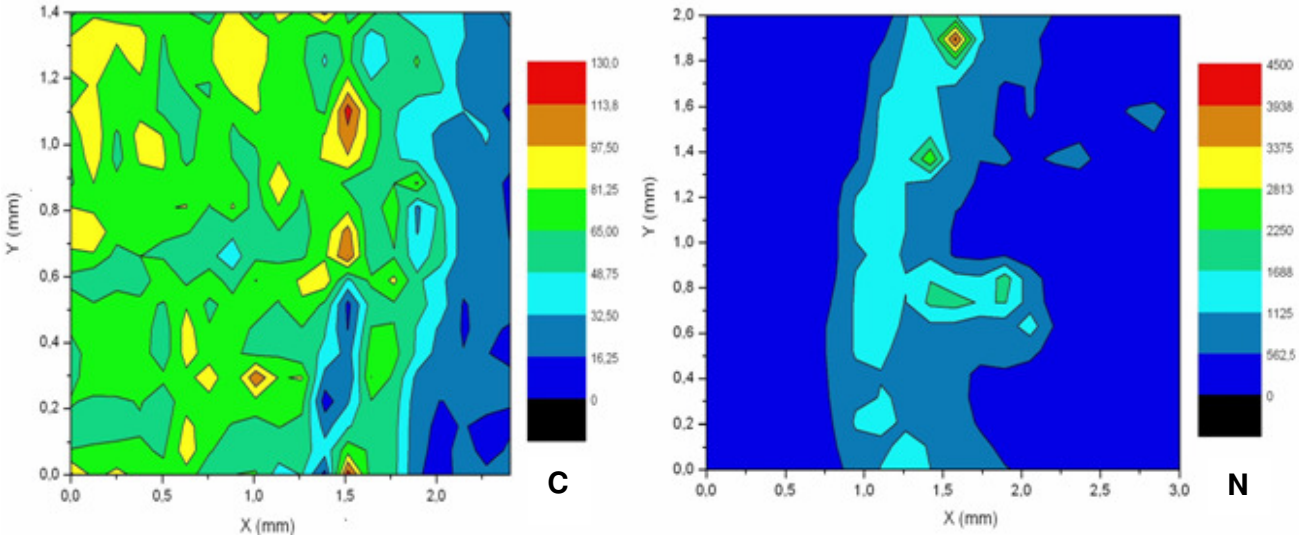


Figura 8 – Mapeamento bidimensional da concentração elementar de cobre em amostra de lentes normais

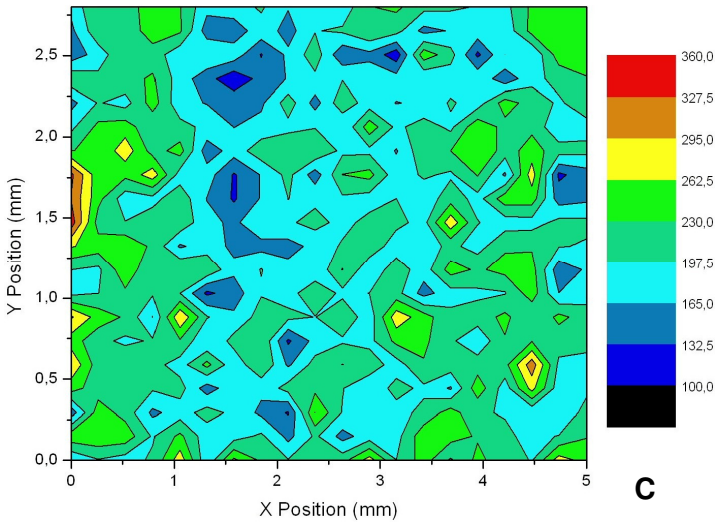


Figura 9 – Mapeamento bidimensional da concentração elementar de cobre em amostra de catarata diabética

Nas figuras 8 e 9 verificamos que não houve diferença significativa na concentração do elemento Cu. Podemos observar somente uma distribuição não uniforme do elemento em toda a amostra de catarata diabética. Embora, foi observado um decréscimo na concentração do Cu foi observado na região cortical na catarata diabética quando comparada com amostra de lente normal.

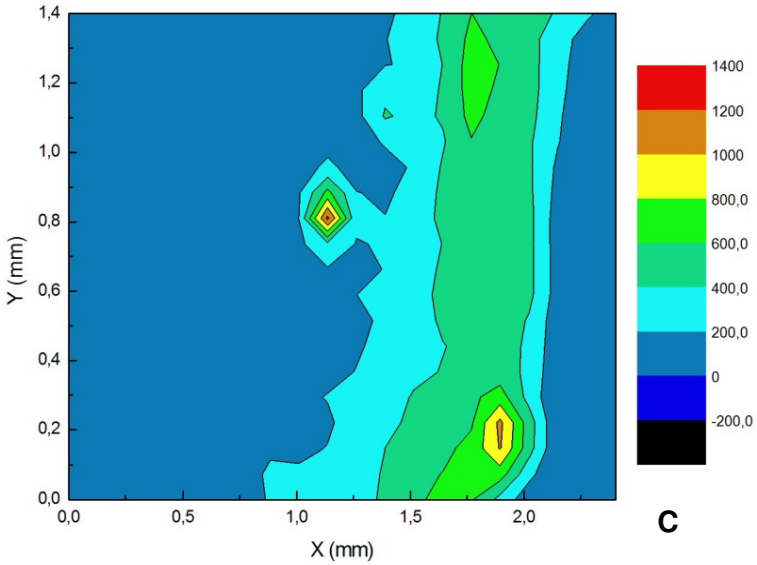


Figura 10 – Mapeamento bidimensional da concentração elementar de zinco em amostra de lentes normais

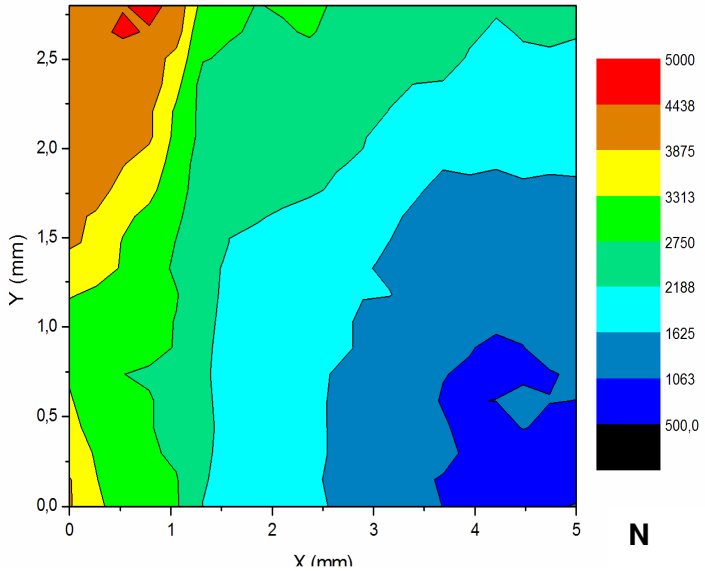


Figura 11 – Mapeamento bidimensional da concentração elementar de zinco em amostra de catarata diabética

Nas figuras 10 e 11 observamos um aumento nos níveis de Zn na região cortical e uma menor concentração na região nuclear na catarata diabética. Contudo, notou-se que o elemento manteve uma distribuição uniforme quando comparado com a lente normal.

5.3 **Propriedade Elástica da Cápsula Anterior da Lente por MFA**

Os resultados obtidos no grupo controle (GCO) e grupo catarata (GCAT) estão apresentados na tabela 6. Não foi observada diferença estatística entre os grupos (p= 0,292). Os valores de elasticidade do GCO e GCTA são apresentada no gráfico 5.

As informações apresentadas foram obtidas a partir da técnica de MFA de contato cujo princípio físico é a interação de Van der Waals na qual uma ponta muito fina é utilizada como uma sonda varrendo a superfície e gerando as imagens topográficas detectadas por um laser que percorre diferentes caminhos óticos devido

à rugosidade apresentada pela amostra e então detectada por um fotodetector. O sistema foi desenvolvido para trabalhar no modo SPM MAC em ar. As pontas utilizadas nas medidas foram do tipo MACLevers tipo II com comprimento variando de 90 to 110 µm e raio de curvatura inferior a 10 nm. Valores típicos de constante da elástica e freqüência ressonante no ar são 0.6 para 2,8 N/m e 75 para 155 kHz, respectivamente. Para os cálculos do valor de elasticidade utilizamos o Modelo de Hertz.

Basicamente o sistema opera no estudo da interação entre uma ponta de prova e a superfície de um dado tecido, durante a varredura da superfície. Para isso, são utilizados alguns componentes tais como scanner, sonda (ponta+cantilever), sistema de detecção da interação ponta – superfície, eletrônica controladora e sistema de realimentação. Com eles, podem-se caracterizar as superfícies estudadas com resolução da escala micrométrica à atômica. Na figura 12 podem ser visualizados os procedimentos de tratamentos de dados executados seguindo os passos explanados no capítulo anterior para determinação da curva de força versus indentação.

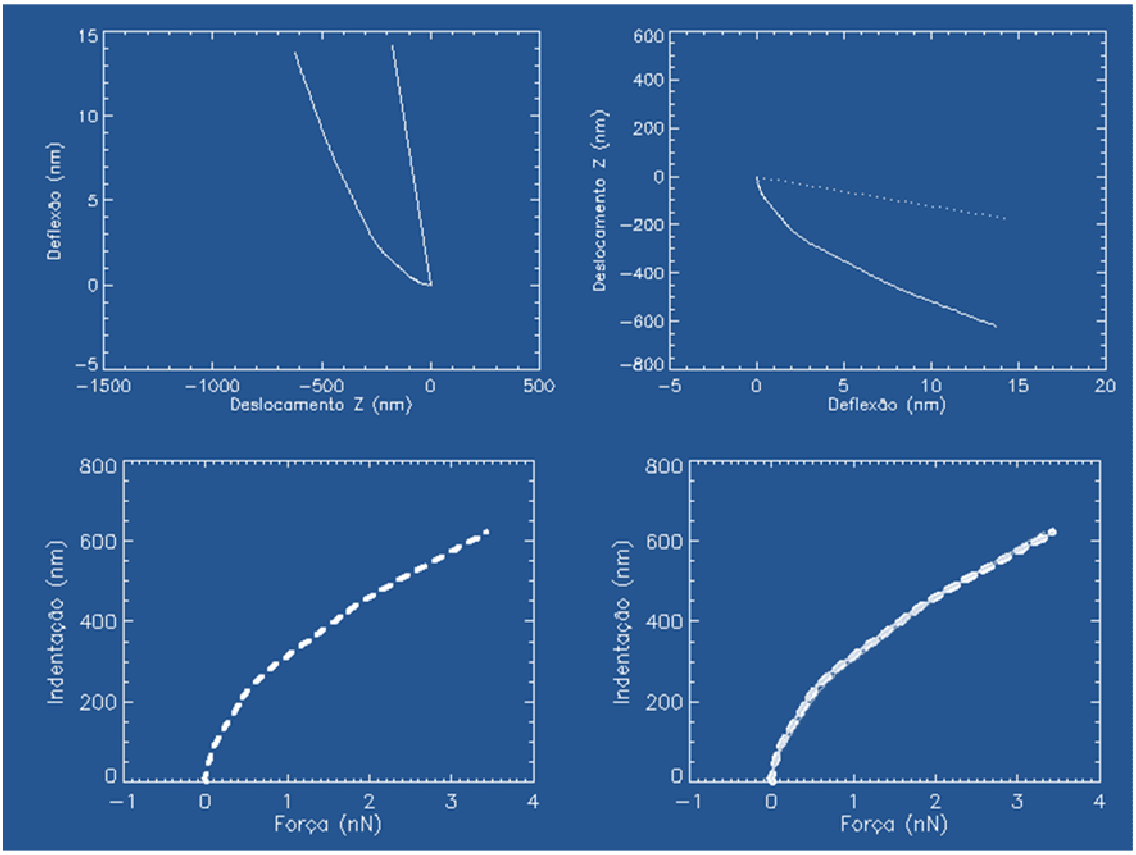


Figura 12 – Representação esquemática do tratamento de dados para determinação da elasticidade local através da força versus indentação

Tabela 6 – Valores de elasticidade para o grupo controle (GCO) e grupo catarata (GCTA) obtida no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo – 2010

Amostra	GCO (kpa)	GCAT (kpa)
1	0,206	0,499
2	0,200	0,488
3	0,225	0,522
4	0,300	0,246
5	-	0,224
6	-	0,240
7	-	0,209
8	-	0,362
9	-	0,279
10	-	0,885
11	-	0,199
Média	**0,233**	**0,377**
DP	0,046	0,209
Mediana	0,100	0,686
Mínimo	0,200	0,199
Máximo	0,300	0,885

DP= Desvio Padrão

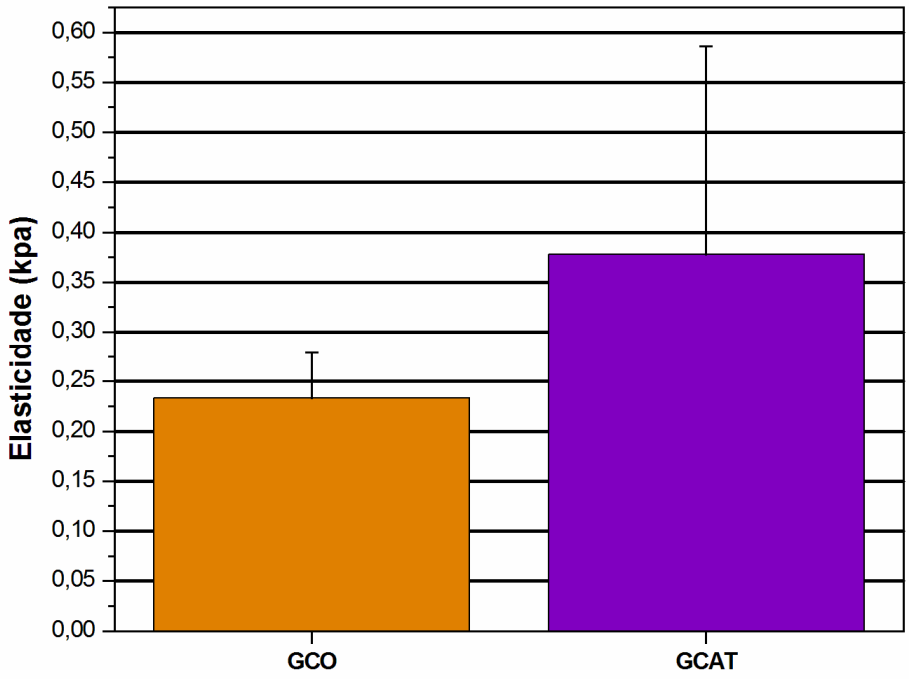


Gráfico 5 – Representação gráfica com os valores de elasticidade para o grupo controle (GCO) e grupo catarata (GCAT)

6 **DISCUSSÃO**

A catarata tem sido relatada como uma das causas mais freqüentes doenças intra-oculares causando a perda de visão no cão (GELATT; MACKAY, 2005). Assim como na medicina veterinária, a catarata tem grande significância na saúde pública. Reconhecida de sua importância, a Organização Mundial da Saúde (OMS) designou esta doença como prioritária buscando preservar ou restabelecer a visão na população mundial (HENNIS et al., 2004).

A transparência da lente é mantida pela constituição e estrutura das proteínas, pela concentração de eletrólitos e outros fatores complexos (GUNDUZ et al., 2003; DAVIDSON; NELMS, 2007). A formação da catarata está associada com o decréscimo da bomba de sódio, potássio, ATPase na célula epitelial, o que pode causar um aumento do conteúdo de sódio e cálcio, e queda da concentração potássio na lente (DAVIDSON; NELMS, 2007).

O diabetes mellitus representa um espectro de desordens, o qual apresenta manifestação clinica primária de uma deficiência relativa ou absoluta de insulina, ou resistência insulínica. Estima-se que o diabetes mellitus afeta de 30 a 35 milhões de pessoas em todo o mundo (THOMPSON; GODIN, 1995).

O diabetes é um fator de risco conhecido para o desenvolvimento de catarata. A maior freqüência de opacidade do cristalino em pacientes diabéticos tem sido descritas na literatura, sendo a hiperglicemia considerada responsável por esta maior prevalência em razão das alterações metabólicas que modificam as proteínas cristalinianas (DAL PIZZOL et al., 2008).

A espécie possui relativamente uma alta prevalência para ocorrência natural da diabetes mellitus, além disso, possui susceptibilidade única para desenvolvimento da catarata subseqüente a doença (BEAM; CORREA; DAVIDSON, 1999). Diante destas características, a espécie canina é vista como um animal modelo ideal da catarata galactosêmica, devido à rápida formação e similaridades com os humanos (SATO et al., 1991).

A catarata diabética tem como característica o intumescimento da lente e formação de vacúolos, em virtude do aumento na permeabilidade da membrana celular, com perda de mioinositol e potássio e um influxo de sódio, e por fim a perda das proteínas lenticulares (cristalinas) (BRON et al. 1993). Diferentes mecanismos

têm sido elucidados para explicar a razão da formação catarata em diabéticos, uma delas é o aumento do estresse oxidativo nestes pacientes (THOMPSON; GODIN, 1995; AYDIN et al., 2005).

6.1 **Concentração Elementar**

A influência de alguns elementos químicos em pacientes diabéticos tem sido avaliada por diversos autores. Em particular, o zinco participa da secreção e transporte de insulina, o cobre e o selênio na proteção antioxidante, podem ter envolvimento direto no metabolismo da glicose (HADRZYNSKI, 1999). Portanto, uma deficiência ou excesso de micronutrientes podem contribuir para complicações do diabetes mellitus (THOMPSON; GODIN, 1995).

O papel dos elementos químicos em cataratas e cataratas diabéticas, o que sugerem a associação destes elementos na formação da catarata, tem sido estudado por inúmeros autores, e algumas técnicas de espectroscopia são empregadas neste estudo incluindo a Espectrometria de Absorção Atômica (BENTLEY; CHIN; GRUB, 1984; COOK; MCGAHAN, 1986; PIERCE et al., 1989; SRIVASTAVA et al., 1992; CEKIC; BARDAK, 1998; HIGHTOWER; MISIAK, 1998; CEKIC et al., 1999; CIARALLI et al., 2001; DAWCZYNSKI, et al., 2002; TANG et al., 2003; GUNDUZ et al., 2003; AYDIN et al., 2005) e Fluorescência de raios X (GALIN; NANO; HALL, 1962; SHUN-SHIN et al., 1993; EKINCI; ASTAM; SAHIN, 2002; SCHAUMBERG et al., 2004).

Ao longo dos últimos anos é possível observar o aumento no interesse no uso da fluorescência de raios X em pesquisas da área médica. Adicionado a este dado, há fortes evidências que elementos químicos estejam intimamente associados na etiologia ou manifestação de diversas doenças (CHWIEJ et al., 2005).

Em um estudo realizado por Silva et al. (2009) em amostras de tecidos mamários neoplásicos e sadios, a fim de quantificar os elementos envolvidos no crescimento tumoral, mostrou que os níveis elementos cálcio, ferro, zinco e cobre foram significante maior nos tecidos neoplásicos, validando a importância dos elementos no desenvolvimento tumoral e as vantagens da fluorescência de raios X

na determinação e investigação dos elementos traço em inúmeras alterações patológicas.

A fluorescência de raios X se presta à avaliação dos elementos traço com alta eficiência em menor tempo, permitindo também o emprego desta ferramenta na determinação dos elementos na odontologia, podendo atribuir informações sobre a fisiologia dos elementos, influência ambiental, hábitos alimentares, ou contaminação por amalgamas metálicas utilizado para restauração dentária (ANJOS et al., 2004).

Na oftalmologia a fluorescência de raios X se fez presente, através desta técnica, Galin, Nano e Hall (1962) determinaram a concentração do zinco em tecidos oculares de seres humanos, notaram que os tecidos pigmentados, em principal a retina e coróide possuíram altas concentrações de zinco. Ekinci, Astam e Dahin (2002) publicaram resultados demonstrando seu potencial na detecção dos elementos em cataratas. Comparou-se a concentração de alguns elementos constituintes na catarata, e concluiu-se que os níveis dos elementos cálcio e potássio foram significantemente elevados, o que sugere a participação dos elementos no desenvolvimento da opacificação lenticular.

A correlação de elementos químicos na lente de animais diabéticos, em especial na espécie canina, é pouco elucidada. Acreditamos que este seja o primeiro estudo sobre o comportamento e concentração dos elementos cálcio, ferro, cobre e zinco em lentes de cães portadores de diabetes mellitus. A grande maioria dos estudos publicados na literatura direcionados a elementos químicos em cataratas diabéticas concentra-se em amostras de lentes de humanos.

Srivastava, Varshney e Pandey (1992), avaliaram a implicação dos elementos químicos na formação da catarata senil em humanos, encontrando um aumento significativo de cobre e zinco quando comparado com lentes normais. E justificam que esta hipótese pode ocorrer em razão de importantes fatores, como aumento da industrialização, poluição ambiental por elementos químicos e seus efeitos sobre a saúde humana, que refletem a possibilidade do acúmulo de metais, e conseqüentemente iniciar um processo cataractogênico ao longo da vida.

As cataratas estão freqüentemente associadas com o decréscimo da bomba sódio, potássio ATPase da célula epitelial da lente, que por sua vez pode causar um aumento no conteúdo de sódio e cálcio, e uma diminuição de potássio, associada a um decréscimo da produção de ATP e redução da atividade antioxidante (DAVIDSON; NELMS, 2007).

Sabe-se que tal imbalanço eletrolítico, também ocorre na catarata diabética. A lente possui um equilíbrio ideal da concentração cálcio para a manutenção da transparência lenticular. Tem sido relatado o aumento dos níveis de cálcio em lentes diabéticas. O acúmulo de cálcio acelera a formação de moléculas agregadas de alto peso molecular, reduzindo a transparência da lente (CEKIC; BARDAK, 1998).

No presente estudo, houve um aumento na concentração de cálcio nas amostras analisadas de catarata de cães diabéticos. Este achado corrobora com os estudos realizados por Pierce et al. (1989) e Cekic e Bardak (1998), que observaram um aumento da concentração de cálcio em lentes de ratos diabéticos induzidos experimentalmente. Por outro lado, Tang et al. (2003) não encontrou correlação entre a catarata diabética e a concentração de cálcio, porém, não descartou a possibilidade que mudanças na concentração de cálcio podem contribuir para a formação da catarata diabética.

O ferro, um metal de transição, atua como um catalisador na formação de radicais livres, sendo assim pode potencialmente contribuir na patogenia de inúmeras doenças, incluindo a catarata (GORALSKA et al., 2009). Cekic e Bardak (1997) demonstraram em lentes de ratos diabéticos experimentalmente induzidos, um aumento significativo da concentração de ferro. Dawczynski et al. (2002) e Aydin et al. (2005), correlacionaram o aumento da concentração de ferro em lentes de humanos diabéticos, indicando a relação deste elemento com a opacificação lenticular, porém não houve diferença estatisticamente significante.

Contudo, neste estudo houve uma diminuição dos níveis de ferro na catarata de cães diabéticos quando comparada ao grupo controle. Em estudo realizado por Goralska, Fleisher e Mcgahan (2007), demonstrou que a concentração de ferritina na fibra da lente de cães foi menor em relação à encontrada nas células epiteliais da lente. Adicionado a isto, houve uma diminuição da concentração de ferritina com o avanço da idade, tal diminuição, particularmente em lentes mais velhas, pode estar relacionado com a habilidade limitada em armazenar o ferro de forma segura e assim proteger a lente contra os danos do estresse oxidativo. É possível que a explicação para o resultado obtido resida neste fato.

Lin (1997) demonstrou um aumento significante na concentração de cobre em lentes de humanos diabéticos, este dado foi confirmado por Aydin et al. (2005), sugerindo a influência do cobre na opacificação lenticular em pacientes portadores de diabetes mellitus. Entretanto, o cobre é capaz de gerar radicais livres e acelerar a

opacificação lenticular pela peroxidação de proteínas, lipídeos e outras estruturas da membrana celular (LIN, 1997).

No presente estudo houve diminuição da concentração de cobre em lentes de cães diabéticos quando comparado a lentes normais. O cobre é essencial na regulação da atividade enzimática, incluindo superóxido dismutase, citrocromo oxidade, tirosinase, e uricase (AYDIN et al., 2005). Desta forma, o cobre desempenha um papel importante na formação de superóxido dismutase que atua defensa antioxidante (STRAIN, 1991). Um declínio nos níveis de cobre está relacionado com o aumento no estresse oxidativo (THOMPSON; GODIN, 1995).

Barros et al. (2004), avaliaram os níveis das enzimas antioxidantes em cães da raça Poodle portadores de catarata. Houve diminuição dos níveis da enzima superóxido dismutase, o que constitui um fator de risco para o desenvolvimento da catarata. Este achado está de acordo com o resultado obtido neste trabalho, em relação à concentração de cobre que esta diretamente associada com a regulação da atividade das enzimas antioxidantes.

Houve um ligeiro aumento na concentração de zinco na catarata diabética neste estudo quando comparada a concentração em lentes normais. Os valores obtidos foram 37,3 ± 9,78 $\mu g\ g^{-1}$, 38,1 ± 3,08 $\mu g\ g^{-1}$ e 42,3 ± 17,2 $\mu g\ g^{-1}$, para os GCO, GDM IPEN, GDM LISBOA respectivamente. Porém esta diferença não foi estatisticamente significante. Dawczynski et al. (2002) e Aydin et al. (2005) obtiveram o mesmo resultado em estudo com cataratas diabéticas e não diabéticas em humanos, entretanto, Gunduz et al. (2003) relatou um aumento significante dos níveis de zinco em catarata diabética senil comparada com catarata senil não diabética.

Inúmeras proteínas estão diretamente relacionadas com o transporte de zinco (GRAHN et al., 2001). De tal maneira, pode-se justificar a influência do zinco na integridade estrutural das proteínas que estão envolvidas na manutenção da transparência lenticular (BENTLEY; CHIN; GRUBB, 1984; DAWCZYNSKI et al., 2002). Além disso, o zinco está envolvido na proteção contra a oxidação dos grupos sulfídricos e formação de radicais livres (BENTLEY; CHIN; GRUBB, 1984) através da inibição dos metais de transição, competindo com o ferro e cobre nos sítios de ligação (THOMPSON; GODIN, 1995; ROUSSEL, 2000). Embora, um aumento nos níveis de zinco possa gerar a oxidação e agregação de proteínas insolúveis na lente,

e aumento da permeabilidade vascular, que são processos inerentes a cataractogênese (GUNDUZ et al., 2003).

A concentração elementar total, obtida no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) foi validada através da concentração relativa obtida no Centro de Física Atômica em Lisboa. Entretanto, a análise da concentração do elemento cálcio obtida no Centro de Física Atômica apresentou uma importante diminuição dos valores em relação ao grupo controle (GCO). É possível que a explicação para este achado esteja nas áreas analisadas das amostras de catarata diabética, o qual poderia haver menor concentração de cálcio. Tem provado-se que áreas opacas de amostras de catarata diabética de coelhos contêm mais cálcio do que áreas vizinhas não opacas (CEKIC; BARDAK, 1998).

Em pacientes diabéticos, o organismo é afetado pela cronicidade e instabilidade dos níveis glicêmicos e conseqüentemente aumento no estresse oxidativo (THOMPSON; GODIN, 1995).

6.2 **Mapas de Distribuição Elementar**

O conhecimento da distribuição espacial e da concentração local dos elementos traços nos tecidos é de grande importância em virtude do envolvimento nas funções biológicas dos organismos vivos (BOHIC et al., 2001).

A microfluorescência de raios X utilizando a radiação Síncrotron é uma técnica que permite o mapeamento multielementar em amostras biológicas. Serpa et al. (2008) determinou a distribuição do ferro, zinco e cobre em cortes coronais de cérebros de ratas e comparou a concentração destes elementos em diferentes idades, evidenciando um aumento dos níveis dos elementos com o avanço da idade. Estes achados reforçam a idéia que estes elementos estejam envolvidos em doenças neurológicas associado à idade.

A microfluorescência de raios X permite determinar o posicionamento de cada elemento químico na amostra, e obter o mapeamento elementar bidimensional (SERPA et al., 2008). É um equipamento moderno para análise da composição elementar de diversas amostras. Uma importante vantagem desta técnica é a

capacidade de analisar amostras pequenas, assim, menos energia é empregada o que resulta em menor dano térmico (LANKOSZ et al., 2004), e mínima preparação da amostra quando comparada a outras técnicas de espectroscopia (ADAMS; JANSSENS; SNIGIREV, 1998).

Esta técnica foi utilizada neste trabalho para determinar a topografia dos elementos traços ferro, cobre e zinco em lentes normais e com catarata diabética.

As mudanças observadas na catarata diabética são inicialmente a formação de vacúolos na região equatorial do córtex que se estende para o córtex anterior e posterior. O processo de progressão se completa com a opacificação cortical da lente, e as suturas freqüentemente podem estar fraturadas ou alargadas devido à água embebida para a interior da lente. A formação da catarata no cão é de progressão rápida e bilateral (CULLEN; WEBB, 2007).

A prevalência da formação da catarata diabética esta relacionada com os níveis de hiperglicemia, da qual a espécie canina é susceptível. Além de simples forças osmóticas atuando na formação da catarata diabética, outros mecanismos patogênicos, como mudança na permeabilidade da membrana celular, forças oxidativas, e glicosilação não-enzimatica das proteínas solúveis, podem contribuir e exacerbar a opacificação da lente em pacientes diabéticos (DAVIDSON; NELMS, 2007). Estas alterações podem promover o influxo de elementos químicos envolvidos no estresse oxidativo e comprometer substancialmente a integridade tecidual.

Os níveis de ferro no humor aquoso e no humor vítreo é muito baixa, refletindo a habilidade da barreira hemato-aquoso em prevenir a entrada de ferro plasmático que é transportado por uma proteína, a transferrina, para o olho. Porém, durante a inflamação, com a quebra da barreira hemato-aquoso, a lente acumula ferro. Devido à idade, mecanismos de regulação dos níveis de ferro podem estar comprometidos, contribuindo para o acúmulo do metal, favorecendo o estresse oxidativo e formação da catarata (GORALSKA et al., 2009).

O mapa de distribuição do ferro apresentou um aumento da concentração na região nuclear, em um ponto próximo a zona equatorial na amostra de catarata diabética. Esta alteração observada pode ser explicada, devido à zona equatorial ser a região da lente, mais ativa metabolicamente (SAMUELSON, 2007), e conseqüentemente nesta região pode haver maior acúmulo deste metal durante o processo caractogênese.

O cobre é um metal de transição essencial para as atividades enzimáticas nos mamíferos (LIN, 1997). Sendo evidente o importante papel do cobre nas defesas antioxidantes através da manutenção da atividade da enzima superóxido dismutase (STRAIN, 1991). Contudo um decréscimo na concentração de cobre pode aumentar o estresse oxidativo (THOMPSON; GODIN, 1995).

O mapa bidimensional do cobre não revelou alterações na concentração, entretanto, tenha sido observada uma desorganização do elemento na amostra de catarata diabética quando comparado a lente normal.

Os metais de transição, como ferro e cobre, têm participação nas reações oxidativas gerando radical hidroxila, que é altamente reativo, desnaturando lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos (LIN, 1997). Os radicais livres produzidos lentamente pela auto-oxidação da glicose são causas substanciais para a alteração estrutural das proteínas lenticulares expostas a altas concentrações de glicose em estudos experimentais. Essas reações podem ser aceleradas pelos metais de transição (CEKIC; BARDAK, 1998).

A lente possui altas concentrações de anidrase carbônica o qual contém zinco, portando a presença desta enzima pode explicar em parte a presença deste metal na lente (GALIN; NANO; HALL, 1962; BENTLEY; CHIN; GRUBB, 1984). O zinco tem sua passagem facilitada através do humor aquoso, isto é facilmente observado através da região cortical, sendo metabolicamente mais ativa, acumula mais zinco nesta região quando comparada com a região nuclear (SRIVASTAVA; VARSHNEY; PANDEY, 1992). Foi possível observar tal condição nos mapas bidimensionais de zinco, onde se encontrou maior acúmulo deste metal na região cortical em amostra de catarata diabética.

Contudo, o comportamento do elemento zinco na amostra de catarata diabética se manteve, ao passo que os outros elementos analisados, ferro e cobre, apresentaram uma descaracterização do tecido, mostrando assim maior potencial de dano oxidativo, o qual estes elementos, em particular, possuem.

6.3 **Elasticidade da Cápsula Anterior da Lente**

A propriedade biomecânica da cápsula da lente tem sido atribuída elevada importância em relação à cirurgia de catarata. Poucos estudos, entretanto, foram realizados para descrever quantitativamente as propriedades mecânicas da cápsula da lente em humanos (KRAG; OLSEN; ANDREASSEN, 1997).

A principal estrutura componente da membrana basal da cápsula da lente é de colágeno tipo IV, disposta de forma tri-dimensional. A cápsula da lente é facilmente deformada quando submetida à leve pressão, devido à reorientação e alinhamento da estrutura molecular em direção da deformação. Com o avanço da idade, a rigidez elástica da cápsula da lente aumenta a leve pressão, e concomitantemente a elasticidade diminui (KRAG; ANDREASSEN, 2003).

Diversas técnicas foram descritas na literatura para avaliação da elasticidade como pressão volumétrica (FISHER, 1971), excimer laser (KRAG; OLSE; ANDREASSEN, 1997). Algumas desvantagens são atribuídas a algumas técnicas de elasticidade, como não obter valores absolutos, e necessitarem de bastante atenção em relação à calibração do equipamento e preparação da amostra (ZIEBARTH et al., 2007).

A microscopia de força atômica (MFA) é uma técnica de alta resolução que permite avaliar amostras de forma não invasiva em condições ambientais e com mínima preparação (TSILIMBARIS et al., 2000). Em sistemas biológicos, esta técnica possibilita a compreensão dos fenômenos biofísicos e bioquímicos envolvidos, constituindo-se em mais uma ferramenta auxiliar de análise e proporcionando um rápido desenvolvimento interdisciplinar (FERREIRA; YAMANAKA, 2006). Contudo, a MFA proporciona com precisão a análise das propriedades mecânicas de tecidos biológicos (VINCKIER; SEMENZA, 1998).

Todo o conhecimento gerado sobre a elasticidade da cápsula da lente tem sido obtido em humanos. Há diversos estudos voltados para propriedades biomecânicas em primatas, por apresentar similaridades com os humanos (ZIERBARTH et al., 2007).

Este estudo demonstrou a viabilidade utilizando a técnica de microscopia de força atômica (MFA) em amostras de cápsula anterior da lente em cães portadores

de catarata, objetivando a análise da elasticidade. Acreditamos que este seja o primeiro estudo com elasticidade de cápsula na espécie canina.

A caracterização microscópica de tecidos patológicos tem sido uma das maiores limitações, em relação a uma pequena área de um tecido. Mapear possíveis mudanças nos tecidos e correlacioná-los com casos clínicos não é um procedimento fácil para estudar certas doenças, como por exemplo, a perda de visão relacionada a doenças, em particular, a catarata (ANTUNES et al., 2006).

A metodologia aplicada neste presente estudo foi baseada de acordo com o estudo realizado por Krag, Olsen e Andreassen (1997), que mantiveram as cápsulas obtidas em - 80℃. Evitou-se neste estudo o armazenamento das cápsulas obtidas após a cirurgia, em soluções salinas, devido às alterações físicas que pudessem vir a ocorrer. Um estudo realizado por Augusteyn et al. (2006), avaliando diversos meios de preservação, constatou-se que soluções salinas podem promover um aumento na espessura e volume da lente. Diante dado, utilizou-se no presente trabalho a solução salina balanceada somente durante as medidas elasticidade.

De uma maneira mais geral, a elasticidade de um tecido pode ser descrita como uma relação entre tensão e deformação. A tensão pode ser descrita como a força por um corte transversal sob um dado material. A deformação mede a elasticidade (o limite do esticar) do material e pode ser calculado como uma mudança no comprimento do tecido dividido pelo seu comprimento original.

Estudos com a cápsula da lente em humanos indicam que o envelhecimento da cápsula da lente está associado à progressiva perda da resistência mecânica, o qual acompanha as mudanças morfológicas da cápsula da lente (KRAG; ANDREASSEN, 2003). Em estudo realizado por Krag, Olsen e Andreassen (1997), investigaram a influência da idade na propriedade biomecânica na cápsula da lente em humanos, concluíram que com a idade a cápsula se torna mais espessa, porém menos elástica e muito mais frágil.

A mudança na espessura da cápsula com avanço da idade também foi investigada e confirmada na espécie canina por Bernays e Peiffer (2000). Os autores deste mesmo estudo também correlacionaram a espessura da cápsula de cães normais e cães portadores de catarata, e concluíram que não houve diferença significativa.

Umas das mudanças biofísicas que podem ocorrer na cápsula da lente em decorrência da idade é o aumento das ligações cruzadas, devido em parte da

glicação (BRON et al., 2000), o qual pode limitar sua deformação (KRAG; ANDREASSEN, 2003).

As moléculas de colágeno da cápsula da lente aparentemente apresentam uma duração maior no tempo de vida. E esta característica pode promover grande possibilidade para as modificações pós-translacional das moléculas como glicosilação (glicação, modificação covalente) não-enzimática, que pode alterar as propriedades mecânicas da cápsula da lente através da formação de ligações cruzadas estáveis (BRON et al., 2000; KRAG; ANDREASSEN, 2003). Tal efeito também pode ocorrer em lentes de pacientes diabéticos, o que resulta em maior rigidez e fragilidade a cápsula da lente (DANYSH; DUNCAN, 2009).

No presente estudo, os resultados revelaram que houve ligeiro aumento na deformação nas amostras do grupo GCAT em comparação com GCO (0,377 ± 0,209 versus 0,233 ± 0,046), porém esta diferença não foi estatisticamente significante. Este achado indica que as amostras analisadas do GCAT apresentaram ligeiro aumento da elasticidade em relação ao GCO.

A cápsula anterior e posterior pode tornar-se mais finas com o intumescimento da lente, e pode ocorrer o enrugamento da cápsula da lente em estágios avanços de desenvolvimento da catarata (DAVIDSON; NELMS, 2007).

É possível que a explicação para o resultado obtido neste estudo resida na alteração morfológica da cápsula da lente que ocorre em razão da formação da catarata. E em virtude da sensibilidade do equipamento foi possível observar essa alteração. Este resultado deve ser considerado com cautela devido ao número de amostras analisadas.

7 **CONCLUSÃO**

Com base no que resultados encontrados podem concluir que:

A Fluorescência de raios X mostrou-se eficiente na da concentração e distribuição elementar de elementos químicos em cataratas de cães portadores de diabetes mellitus.

A microscopia de força atômica proporcionou medidas de elasticidade rápidas e precisas em amostras de cápsula anterior da lente de cães, com mínima preparação da amostra.

Nas amostras de cataratas diabéticas de cães apresentam uma diminuição na concentração de ferro e cobre, o que pode contribuir para a exacerbação do estresse oxidativo.

Há um aumento da concentração de cálcio em cataratas diabéticas de cães, e corrobora positivamente com as hipóteses da literatura.

Os mapas bidimensionais proporcionaram a avaliação topográfica dos elementos ferro, cobre e zinco em amostras de catarata diabética em cães.

A cápsula anterior da lente de cães portadores de catarata apresenta aumento da elasticidade, isto provavelmente se deve a alteração morfológica da cápsula anterior da lente em razão da progressão da catarata.

REFERÊNCIAS

ADAMS, F.; JASSENS, K.; SNIGIREV, A. Microscopic X-ray fluorescence analysis methods with laboratory and synchrotron radiation sources. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 13, p. 319-331, 1998.

ANJOS, M. J.; BARROSO, R. C.; PERÉZ, C. A.; BRAZ, D.; MOREIRA, S.; DIAS, K. R. H. C.; LOPES, R. T. Elemental mapping of teeth using µSRXRF. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 213, p. 569-573, 2004.

ANTUNES, A.; GOZZO, F. V.; BORELLA, M. I.; NAKAMURA, M.; SAFATLE, A. M. V.; BARROS, P. S. M.; TOMA, H. E. Atomic force imaging of ocular tissues: morphological study of healthy and cataract lenses. **Modern Research and Educational Topics in Microscopy**, p. 29-36, 2007a.

ANTUNES, A.; GOZZO, F. V.; NAKAMURA, M.; SAFATLE, A. M. V.; MORELHÃO, S. L.; TOMA, H. E.; BARROS, P. S. M. Analysis of the healthy rabbit lens surface using MAC mode atomic force microscopy. **Micron**, v. 38, p. 286-290, 2007b.

ANTUNES, A.; SAFATLE, A. M. V.; BARROS, P. S. M.; MORELHÃO, S. L. X-ray imaging in advanced studies of ophthalmic diseases. **Medical Physics**, v. 33, n. 7, p. 2338-2343, 2006.

AUGUSTEYN, R. C.; ROSEN, A. M.; BORJA, D.; ZIEBARTH, N. M.; PAREL, J. M. Biometry of primate lenses during immersion in preservation media. **Molecular Vision**, v. 12, p. 740-747, 2006.

AYDIN, E.; CUMURCU, T.; OZUGURLU, F.; OZURT, H.; SAHINOGLU, S.; MENDIL, D.; HASDEMIR, E. Levels of iron, zinc, and cooper in aqueous humor, lens, and serum in nondiabetic and diabetic patients. **Biological Trace Elements Research**, v. 108, p. 3-41, 2005.

BARROS, P. S. M.; ANGELOTTI, A. C.; NOBRE, F., MORALES, A.; FANTONI, D. T.; BARROS, S. B. M. Antioxidants profile of cataractous english Cocker Spaniels. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, p. 83-86, 1999.

BARROS, P. S. M.; SAFATLE, A. M. V.; SILVA, H. A. R.; BARROS, S. B. M. Ascorbic acid levels in plasma and aqueous humor of dogs with diabetic cataracts. **Veterinary Ophthalmology**, v. 5, n. 4, p. 296, 2002. American College of Veterinary Ophthalmologists, 33 rd Meeting, Denver, USA.

BARROS, P. S. M.; SAFATLE, A. M. V.; QUEIROZ, L.; SILVA, V. V.; BARROS, S. B. M. Blood and aqueous humor antioxidants in cataractous Poodles. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 39, p. 19-24, 2004.

BASHER, A. W. P.; ROBERTS, S. M. Ocular manifestations of diabetes mellitus: diabetic cataract in dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 25, n. 3, p. 661-676, 1995.

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

BENTLEY, P. J.; CHIN, B.; GRUBB, B. Some observations on the zinc metabolism of the rabbits lens. **Experimental Eye Research**, n. 38, p. 467-507, 1984.

BERNAYS, M. E.; PEIFFER, R. L. Morphologic alterations in the anterior lens capsule of canine eyes with cataracts. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 12, p. 1517-1519, 2000.

BOHIC, S.; SIMIONOVICI, A.; ORTEGA, R.; HEYMANN, D.; SCHROER, C., SNIGIREV, A. Synchrotron-induced X-ray microfluorescence on single cells. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 181, p. 728-733, 2001.

BRON, A. J.; SPARROW, J.; BROWN, N. A. P.; HARDING, J. J.; BLAKYTNY, R. The lens in diabetes. **Eye**, n. 7, p. 260-275, 1993.

BRON, A. J.; VRENSEN, G. F. J. M.; KORETZ, J.; MARAINI, G.; HARDING, J.J. The ageing lens. **Ophthalmologica**, v. 214, p. 86-104, 2000.

CATCHPOLE, B.; RISTIC, J. M.; FLEEMAN, L. M.; DAVISON, L. J. Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks?. **Diabetologia**, n. 48, p. 1948-1956, 2005.

CEKIC, O.; BARDAK, Y. Lenticular calcium, magnesium, and iron levels in diabetic rats and verapamil effect. **Ophthalmic Research**, n. 30, p. 107-112, 1998.

CEKIC, O.; BARDAK, Y.; TOTAN, Y.; KAVAKLI, S.; AKYOL, O.; OZDEMIR, O.; KAREL, F. Nickel, chromium, manganese, iron and aluminum levels in human cataractous and normal lenses. **Ophthalmic Research**, n. 31, p. 332-336, 1999.

CHWIEJ, J.; SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA, M.; LANKOSZ, M.; WOJCIK, S.; FLAKENBERG, G.; STEGOWSKI, Z.; SETKOWICZ, Z. Preparation of tissue samples for X-ray fluorescence microscopy. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 60, p. 1531-1537, 2005.

CIARALLI, L.; GIORDANO, R.; COSTANTINI, S.; SEPE, A.; CRUCIANI, F., MORAMARCO, A.; ANTONELLI, B.; BALACCO-GABRIELI, C. Element concentrations and cataract: an experimental animal model. **Journal of Trace Elements**, v. 14, p. 205-209, 2001.

COOK, C. S.; MCGAHAN, M. C. Cooper concentration in cornea, iris, normal, and cataractous lens and intraocular fluids of vertebrates. **Current Eye Research**, v. 5, n. 1, p. 69-76, 1986.

CULLEN, C. L.; WEBB, A. Ocular manifestations of systemic diseases. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**, 4 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. p. 1509-1511.

DAL PIZZOL, M. M.; ESTEVES, J. F.; SCCOCO, C. A.; HOGGIA, M. F.; ROSA, C. M.; LAMBERT, J. H. F.; CANANI, L. H. Catarata e diabetes mellitus tipo 1. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 71, n. 4, p. 564-567, 2008.

DANYSH, B. P.; DUNCAN, M. K. The lens capsule. **Experimental Eye Research**, v. 88, p. 151-164, 2009.

DAVISON, M. G.; NELMS, S. R. Diseases of the canine lens and cataract formation. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**, 4 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. p. 859-887.

DAWCZYNSKI, J.; BLUM, M.; WINNEFELD, K.; STROBEL, J. Increased content of zinc and iron in human cataractous lenses. **Biological Trace Elements Research**, v. 90, p. 15-23, 2002.

EKINCI, N.; ASTAM, N.; SAHIN, Y. Qualitative and quantitative analysis of the cataract using EDXRF. **Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer**, v. 72, p. 783-787, 2002.

FAHRNI, C. J. Biological applications of X-ray fluorescence microscopy: exploring the subcellular topography and speciation of transition metals. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, p. 121-127, 2007.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Canine diabetes mellitus. In: **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**, 3. ed. Philadelphia: Elsevier, 2004. p. 486-538.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.

FILHO, V. F. N., Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão (ED-XRF) e por reflexão total (TXRF). **Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) – USP**, 1999. Disponível em: <www.cena.usp.br/apostilas/Virgilio/cen-5723/EDXRF_TXRF.doc>. Acesso em: 21 Set. 2009.

FISHER, R. F. The elastic constants of the human lens. **Journal of Physiology**, v. 212, p. 147-180, 1971.

FLEEMAN, L. M.; RAND, J. S. Management of canine diabetes. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 31, n. 5, p. 855-880, 2001.

FOTIADIS, D.; SCHEURING, S.; MULLER, S. A.; ENGEL, A.; MULLER, D. J. Imaging and manipulation of biological structures with the AFM. **Micron**, v. 33, p. 385-397, 2002.

GALIN, M. A.; NANO, H. D.; HALL, T. Ocular zinc concentration. **Investigative Ophthalmology**, v. 1, n. 1, p. 142-148, 1962.

GELATT, K. N.; MACKAY, E. Prevalence of primary breed-related cataracts in the dogs in North America. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 2, p. 101-111, 2005.

GLOVER, T. D.; CONSTANTINESCU, G. M. Surgery for cataracts. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 27, n. 5, p. 1143-1173, 1997.

GORALSKA, M.; FLEISHER, L. N.; MCGAHAN, M. C. Ferritin H- and L-chains in fiber cell canine and human lens of different ages. **Investigate Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, n. 9, 2007.

GORALSKA, M.; FERRELL, J.; HARNED, J.; LALL, M.; NAGAR, S.; FLEISHER, L. N.; MCGAHAN, M. C. Iron metabolism in the eye: a review. **Experimental Eye Research**, p. 1-12, 2009.

GRAHN, B. H.; PATTERSON, P. G.; GOTTSCHALL-PASS, K. T., ZHANG, Z. Zinc and the eye. **Journal of American College of Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 106-118, 2001.

GUNDUZ, G.; GUNDUZ, F.; YUCEL, I.; SENTURK, U. K. Levels of zinc and magnesium in senile and diabetic senile cataractous lenses. **Biological Trace Element Research**, v. 95, p. 107-112, 2003.

GUPTILL, L.; GLICKMAN, L.; GLICKMAN, N. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: analysis of veterinary medical data base records (1970-1999). **The Veterinary Journal**, n. 165, p. 240-247, 2003.

HADRZYNSKI, C. Diabetes and trace elements. **The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, n. 12, p. 367-374, 1999.

HENNIS, A.; WU, S. Y.; NEMESURE, B.; LESKE, C. Risk factors for incident cortical and posterior subcapsular lens opacities in the barbados eye studies. **Archive Ophthalmology**, v. 122, p. 525-530, 2004.

HIGHTOWER, K. R.; MISIAK, P. The Relationship between osmotic stress and calcium elevation: in vitro and In vivo rat lens models. **Experimental Eye Research**, n. 66, p. 775-781, 1998.

HOENING, M. Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, n. 197, p. 221-229, 2002.

KIM, C. J.; CHOI, S. K. Analysis of aqueous humor calcium and phosphate from cataract eyes with and without diabetes mellitus. **Korean Journal of Ophthalmology**, v. 21, n. 2, p. 90-94, 2007.

KRAG, S.; ANDREASSEN, T. T. Mechanical properties of the human lens capsule. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 22, p. 749-767, 2003.

KRAG, S.; OLSEN, T.; ANDREASSEN, T. T. Biochemical characteristics of the human anterior lens capsule in relation to age. **Investigative Ophthalmology**, v. 38, n. 2, p. 357-363, 1997.

LANKOSZ, M.; SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA, M.; CHWIEJ, J., OSTACHOWICZ, J.; SIMIONOVICI, A.; BOHIC, S. Research in quantitative microscopic X-ray fluorescence analysis. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 59, p. 1517-1521, 2004.

LAUS, J.L.; TORRECILHAS, A.; BRUNELLI, J.; ORIA, A. P.; ALMEIDA, D. E.; TALIERI, I. C. Afecções da lente. In: HERRERA, D. **Oftalmologia Clínica em Animais de Companhia**. 1 ed. São Paulo: MedVet Livros, 2008, p. 141-154.

LEVY, J. Abnormal cell calcium homeostasis in type 2 diabetes mellitus. **Endocrine**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 1999.

LEVY, J.; GAVIN, J. R.; SOWERS, J. R. Diabetes mellitus: a disease of abnormal cellular calcium metabolism?. **The American Journal of Medicine**, v. 96, p. 260-273, 1994.

LIN, J. Pathophysiology of cataracts: cooper ion and peroxidation in diabetes. **Japanese Journal Ophthalmology**, n. 41, p. 130-137, 1997.

NELSON, R. W. Diabete melito. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**, v. 2, 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 1516-1539.

NEUMANN, T. Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy. **JPK Instruments – Application Report**. Disponível em: <www.jpk.com/index.230.html>. Acesso em: 01 Ago. 2010.

OMS. Cataract. **World Health Organization**. Disponível em: <http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index1.html>. Acesso em: 01 jan. 2010.

OISHI, N.; MORIKUBO, S.; TAKAMURA, Y.; KUBO, E.; TSUZUKI, S.; TANIMOTO, T.; AKAGI, Y. Correlation between adult diabetic cataract and red blood cell aldose redutase levels. **Investigate Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 5, p. 2061-2064, 2006.

PARK, S. A.; YI, N. Y.; JEONG, M. B.; KIM, W. T.; KIM, S. E.; CHAE, J. M.; SEO, K. M. Clinical manifestations of cataracts in small breed dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 4, p. 205-210, 2009.

PIERCE, G. N.; AFZAL, N.; KROEGER, E. A.; LOCKWOOD, M. K.; KUTRYK, M. J. B.; ECKHERT, C. D.; DHALLA, N. S. Cataract formation is prevented by administration of verapamil to diabetic rats. **Endocrinology**, v. 125, n. 2, p. 730-735, 1989.

RAMSELL, T. G. Lens capsule in diabetes. **British Journal Ophthalmology**. v. 53, p. 98-100, 1969.

RAND, J. S.; FLEEMAN, L. M.; FARROW, H. A.; APPLETON, D. J.; LEDERER, R. Canine and feline diabetes mellitus: nature or nurture?. **The Journal of Nutrition**, n. 134, p. 2072-2080, 2004. Suplemento.

ROUSSEL, A. M. New Aspects on trace element metabolism disturbances in man and pet animals. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 151, n. 7, p. 637-642, 2000.

SAFATLE, A. M. V. **Eletrorretinograma de campo total em cães diabéticos com catarata**. 2008. 129f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SALERNO, M.; BYKOV, I. Tutorial: mapping adhesion forces and calculating elasticity in contact-mode AFM. **Microscopy and Analysis**, v. 20, n. 2, p. 5-8, 2006.

SAMUELSON, D. A. Ophthalmic anatomy. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**, 4 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. p. 37-148.

SATO, S.; TAKAHAHI, Y.; WYMAN, M.; KADOR, P. Progression of sugar in cataract in the dogs. **Investigate Ophthalmology & Visual Science**, v. 32, n. 6, p. 1925-1931, 1991.

SCHAUMBERG, D. A.; MENDES, F.; BALARAM, M.; DANA, M. R.; SPARROW, D., HU, H. Accumulated lead exposure and risk of age-related cataract in men. **Journal of American Medical Association**, v. 292, n. 22, p. 2750-2755, 2004.

SERPA, R. F. B. **Análise multielementar de tecidos cerebrais através da fluorescência de raios X por reflexão total**. 2007. 204f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Nuclear) – Faculdade de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SERPA, R. F. B.; JESUS, E. F. O.; ANJOS, M. J.; OLIVEIRA, L. F.; MARINS, L. A.; CARMO, M. G. T.; JUNIOR, J. D. C.; ROCHA, M. S.; LOPES, R. T.; MARTINEZ, A. M. B. Topographic trace-elemental analysis in the brain of Wistar rats by X-ray microfluorescence with syncotron radiation. **Analytical Science**, v. 24, p. 839-842, 2008.

SHUN-SHIN G. A.; VRENSEN G. F. J. M.; BROWN, N. P.; WILLEKENS B.; SMEETS, M. H.; BRON, A. J. Morphologic characteristics and chemical composition of christmas tree cataract. **Investigate Ophthalmology & Visual Science**, v. 34, n. 13, p. 3489-3496, 1993.

SILVA, M. P.; TOMAL, A.; PÉREZ, C. A.; RIBEIRO-SILVA, A.; POLETTI, A. E. Determination of ca, fe, cu and zn and their correlations in breast cancer and Normal adjacent tissues. **X-ray Spectrometry**, v. 38, p. 103-111, 2009.

SLATTER, D. Lente. In: **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**, 3. ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 410-439.

SRIVASTAVA, V. K.; VARSHNEY, N.; PANDEY, D. C. Role of trace elements in senile cataract. **Acta Ophthalmologica**, v. 70, p. 839-841, 1992.

STAFFORD, M. J. The histology and biology of the lens. **Association of Optometrists**, City University London, 2001. Disponível em: <http://www.optometry.co.uk/articles.php?year=2001>. Acesso em: 03 dez. 2008.

STRAIN, J. J. Disturbances of micronutrients and antioxidants status in diabetes. **Proceedings of Nutrition Society**, n. 50, p. 501-604, 1991.

TANG, D.; BORCHMAN, D.; YAPPERT, M. C.; VRENSEN, G. F. J. M.; RASI, V. Influence of age, diabetes, and cataract on calcium, lipid-calcium, and protein-calcium relationships in human lenses. **Investigate Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 5, p. 2059-2066, 2003.

THOMPSON, K. H.; GODIN, D. V. Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes. **Nutrition Research**, v. 15, n. 9, p. 1377-1410, 1995.

TKACHOV, S. L.; LAUTENSCHLAGER, C.; EHRICH, D.; STRUCK, H. G. Changes in the lens epithelium with respect to cataractogenesis – light microscopic and sheimpflug densitometric analysis of the cataractous and the clear lens of diabetic and non-diabetic. **Graefe´s Archive Clinics Experimental Ophthalmology**, v. 244, p. 596-602, 2006.

TSIMLIMBARIS, M. K.; LESNIEWSKA, E.; IYDATAKI, S.; GRIMELLEC, C. L.; GOUDONNET, J. P.; PALLIKARIS, I. G. The use of atomic force microscopy for the observation of corneal epithelium surface. **Investigative Ophthalmology**, v. 41, n. 3, p. 680-686, 2000.

VINCKIER, A.; SEMENZA, G. Measuring of biological materials by atomic force microscopy. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 430, p. 12-16, 1998.

WILKIE, D. A.; METZLER-GEMENSKY, A. J.; COLITZ, C. M. H.; BRAS, I. D.; KUONEN, V. J.; NORRIS, K. N.; BASHAM, C. R. Canine cataracts, diabetes mellitus and spontaneous lens capsule rupture: A retrospective study of 18 dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 5, n. 9, p. 328-334, 2006.

WILLIAMS, D. L. Oxidation, antioxidants and cataract formation: a literature review. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 5, p. 292-298, 2006.

WILLIAMS, D. L. Oxidative stress and the eye. **Veterinary of North Clinics: Small Animal Practice**, v. 38, p. 179-192, 2008.

WILLIAMS, D. L.; HEATH, M. F.; WALLIS, C. Prevalence of canine cataracts: preliminary results of a cross-sectional study. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 1, p. 29-35, 2004.

YAMAMOTO, S.; HITOMI, J.; SAWAGUCHI, S.; ABE, H.; SHIGENO, M.; USHIKI, T. Observation of human corneal and scleral collagen fibrils by atomic force microscopy. **Japanese Journal Ophthalmology**, v. 46, p. 496-501, 2002.

ZIEBARTH, N. M.; WOJCIKIEWICZ, E. P.; MANNS, F.; MOY, V. T.; PAREL, J. M. Atomic force microscopy measurements of lens elasticity in monkey eyes. **Molecular Vision**, v. 13, p. 504-510, 2007.

ZUCCHI, O. L. A. D.; FACCIOLI, L. H.; NOMIZO, A.; MOREIRA, S.; SÁ-NUNES, A.; BOLZONI, R. M. F.; SANTOS, L. L.; SALVADOR, M. J. SRTXRF analysis of trace elements on inflammatory immune response. **Micronutrients and Health Research**, v. 15, p. 293-307, 2008.

ANEXO

National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material 1577b

Bovine Liver

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use as a control material and in evaluating analytical methods for the determination of major, minor, and trace elements in animal tissue and other biological matrices.

Certified Values of Constituent Elements: The certified values for the constituent elements are given in Table 1. Certified values are based on results obtained by definitive methods of known accuracy; or alternatively, from results obtained by two or more independent analytical methods. Noncertified values are provided for information only in Table 2. Analytical methods used for the analysis of SRM 1577b, including certified and information values, are given in Table 3.

Notice and Warnings to Users:

Expiration of Certification: This certification is invalid after 5 years from the date of purchase and shipment from NIST. Should any of the certified constituents change within a 5-year period purchasers will be notified by NIST.

Stability: The SRM should be kept in its original bottle and stored between 10-30 °C. It should not be exposed to intense sources of radiation. The bottle should be kept tightly closed and stored in a desiccator away from direct sunlight.

Use: A minimum sample of 250 mg of the dried material (see Instructions for Drying) should be used for any analytical determination to be related to the certified values of this Certificate.

Dissolution procedures should be designed to effect complete solution, but without losses of volatile elements, such as mercury. Dissolution for these determinations should be carried out in a closed system.

Statistical consultation was provided by S.B. Schiller of the Statistical Engineering Division.

The overall direction and coordination of the analyses leading to this certification were under the chairmanship of J.R. DeVoe, Chief of the Inorganic Analytical Research Division.

The technical and support aspects involved in the preparation, certification, and issuance of this Standard Reference Material were coordinated through the Standard Reference Materials Program by T.E. Gills.

Gaithersburg, MD 20899
August 27, 1991

William P. Reed, Chie
Standard Reference Materials Progran

(over)

Table 1. Certified Values of Constituent Elements

Element	Content (wt. percent)
Chlorine	0.278 ± 0.006
Phosphorus	1.10 ± 0.03
Potassium	0.994 ± 0.002
Sodium	0.242 ± 0.006
Sulfur	0.785 ± 0.006

Element	Content (µg/g)			Element	Content (µg/g)		
Cadmium	0.50	±	0.03	Molybdenum	3.5	±	0.3
Calcium	116	±	4	Rubidium	13.7	±	1.1
Copper	160	±	8	Selenium	0.73	±	0.06
Iron	184	±	15	Silver	0.039	±	0.007
Lead	0.129	±	0.004	Strontium	0.136	±	0.001
Magnesium	601	±	28	Zinc	127	±	16
Manganese	10.5	±	1.7				

The estimated uncertainty of a certified value is the sum of the half-width of a 95% confidence interval for the mean of results and an allowance for systematic error, except for the uncertainty associated with sulfur which is based on scientific judgment and is roughly equivalent to one percent of the certified value. The systematic error is estimated by the maximum absolute deviation between a single method mean and the grand mean. The grand mean was computed using the weighting scheme of Paule and Mandel (NBS Journal of Research 87, pp 377-385).

Table 2. Noncertified Values of Constituent Elements

Element	Content (wt. percent)
Nitrogen	(10.6)

Element	Content (µg/g)	Element	Content (µg/g)
Arsenic	(0.05)	Cobalt	(0.25)
Aluminum	(3)	Vanadium	(0.123)
Antimony	(0.003)		
Bromine	(9.7)		
Mercury	(0.003)		

Instructions for Drying: Samples of this SRM must be dried before weighing according to the following procedure: Dry for 24 hours at 20 to 25 °C in a vacuum oven at a pressure not greater than 30 Pa (0.2 mm Hg).

Source and Preparation of Material:

The bovine liver for this standard was obtained in the Portland, Oregon area. The gross fat, major blood vessels, and "skin" were removed and the liver was ground. The ground liver was then mixed, transferred to polyethylene-lined trays, and lyophilized by Oregon Freeze Dry Foods, Inc., Albany, Oregon. After lyophilization, the liver was powdered in a Tornado mill, packaged in moisture-proof bags, and then transported to the National Institute of Standards and Technology.

Table 3.

Analytical Methods Used for the Analysis of SRM 1577b

Method	Elements Determined
ETAAS	Ag, Cd, As, Co
FES	Ca, Na, Sr
ICP	Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, Sr
GFAAS	Cu, Mn, Rb, Zn
DCP	P
IC	Cl, S
IDTIMS	K, Pb, Rb, S, Sr
IDSSMS	Cd, Cu, Mo, Se, Zn
INAA	Cl, Cu, Fe, Mn, Na, Rb, Se, Zn, Al, Br, Co, K,V, Mg, Ag
RNAA	Ag, As, Cd, Cu, Hg, Mo, Se, Sb
POL	Fe
Color	P
Kjeldahl	N
CVAAS	Hg
FAAS	Ca, Mg

ETAAS: Electrothermal atomic absorption spectrometry
FES: Flame atomic emission spectrometry
ICP: Inductively coupled plasma emission spectrometry
GFAAS: Graphite furnace atomic absorption spectrometry
DCP: Direct current plasma emission spectrometry
IC: Ion chromatography
IDTIMS: Isotope dilution thermal ionization mass spectrometry
IDSSMS: Isotope dilution spark source mass spectrometry
INAA: Instrumental neutron activation analysis
RNAA: Radiochemical neutron activation analysis
POL: Polarography
Color: Spectrophotometry
Kjeldahl: Titrimetry
CVAAS: Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry
FAAS: Flame Atomic Absorption Spectrometry

Analysts:

Analytical Chemistry Division, National Institute of Standards & Technology:

1. J.V. Bailey
2. I.L. Barnes
3. E.S. Beary
4. C.G. Blendell
5. K.A. Brletic
6. T.A. Butler
7. E.R. Deardorff
8. M.S. Epstein
9. J.W. Gramlich
10. R.R. Greenberg
11. S. Hanamura
12. S.H. Harrison
13. E.F. Heald
14. W.R. Kelly
15. H.M. Kingston
16. W.F. Koch
17. G.M. Lambert
18. R.M. Lindstrom
19. G.J. Lutz
20. L.A. Machlan
21. E.J. Maienthal
22. T.J. Murphy
23. P.J. Paulsen
24. L.J. Powell
25. T.C. Rains
26. T.A. Rush
27. R.L. Watters, Jr.
28. R. Zeisler

Cooperating Analysts:

30. M. Gallorini and E. Orvini, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Centro di Radiochimica e Analisi per Attivazione presso l' Instituto di Chimica Generale dell'Universita, Pavia, Italy.

31. L. Kosta, A.R. Byrne, M. Dermelj, Institute 'Josef Stefan', Ljubljana, Yugoslavia.