DANIELA DE CASTRO LEANDRO

**Avaliação biomecânica de córneas de suínos por
meio da microscopia de força atômica**

São Paulo
2010

DANIELA DE CASTRO LEANDRO

**Avaliação biomecânica de córneas de suínos por
meio da microscopia de força atômica**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica
Veterinária 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:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros

São Paulo

2010

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2388
FMVZ

Leandro, Daniela de Castro

Avaliação biomecânica de córneas de suínos por meio da microscopia de força atômica / Daniela de Castro Leandro. -- 2010.
111 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros.

1. Córnea. 2. Biomecânica. 3. Paquimetria. 4. Suíno. 5. Microscopia de força atômica. 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 "Avaliação biomecânica de córneas suínas por meio da microscopia de força atômica", protocolado sob o nº 1968/2010, utilizando 20 (vinte) olhos suínos provenientes de frigorífico, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Sérgio de Moraes Barros, 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 11/08/2010.

We certify that the Research "Biomechanical analysis of porcine corneas using atomic force microscopy", protocol number 1968/2010, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Sérgio de Moraes Barros, 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 and was approved in the meeting of day 08/11/2010.

São Paulo, 12 de agosto de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LEANDRO, Daniela de Castro

Título: Avaliação biomecânica de córneas de suínos por meio da microscopia de força atômica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária 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. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

À **Deus**, primeiramente, por todos os ensinamentos, valores e virtudes a mim oferecidos durante toda a minha vida.

Aos meus pais, **José Leandro e Lolita**, pelo amor incondicional, apoio e compreensão.

À minha querida irmã e melhor amiga **Renata**, pelo carinho inestimável e insubstituível.

Ao meu namorado **Júlio**, por todo amor, paciência e compreensão. À sua família, pelo imenso carinho.

À querida amiga **Angélica de Mendonça Vaz**
Safatle, por todos os ensinamentos e apoio.

Ao **Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros**, pela
confiança e apoio durante toda esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos **Adriana Cabral Lustoza, Ana Paula Franco do Amaral Hvenegaard, Eduardo Perlmann, Grazielle Massae Shimamura, Luiz Felipe de Moraes Barros, Márcia Pansera Galego, Milena Sefrin Helzel e Renata Squarzoni**, pelos bons e divertidos momentos vividos.

Às colegas **Michelle Barbosa e Débora Gomes**, pela amizade e companheirismo.

Ao **Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Instituto de Química da Universidade de São Paulo**, por possibilitar a realização deste projeto.

Ao colega **Marcelo Nakamura**, pelos ensinamentos e pelo auxílio na análise das amostras por meio da microscopia de força atômica.

À amiga **Andrea Antunes Pereira**, pelo apoio, incentivo e colaboração.

Ao colega **Eduardo B. de Amores**, pelo auxílio com os dados deste projeto.

À **Rejane Figueiredo**, pela realização da análise estatística deste estudo.

Aos **médicos veterinários e residentes do Hospital Veterinário**, pela colaboração e incentivo.

Aos secretários do Departamento de Cirurgia, **Alessandra Sousa e Belarmino Ney Pereira**, pela imensa colaboração.

Aos **funcionários da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, pelo auxílio e colaboração.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, pela oportunidade a mim oferecida.

RESUMO

LEANDRO, D. C. **Avaliação biomecânica de córneas de suínos por meio da microscopia de força atômica.** [Biomechanical analysis of porcine corneas using atomic force microscopy]. 2011. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Atualmente, a avaliação das propriedades biomecânicas da córnea vem sendo considerada um parâmetro importante a ser determinado, uma vez que está relacionado a diversos procedimentos (diagnósticos e cirúrgicos) e oftalmopatias. Devido à complexa disposição de suas lamelas, o estroma corneal é considerado a camada que exerce maior influência sobre as propriedades elásticas da córnea. A busca por modelos experimentais no estudo das propriedades biomecânicas da córnea têm aumentado ultimamente, devido à dificuldade em se obter amostras de córnea humana para fins científicos. Logo, estudos comparativos entre a córnea humana e a suína vêm sendo desenvolvidos, e algumas similaridades foram identificadas entre estas duas espécies. O presente estudo tem como objetivo avaliar as propriedades biomecânicas de diferentes regiões da córnea suína por meio da microscopia da força atômica. Dezesseis bulbos oculares não escaldados, de oito animais da espécie suína, foram adquiridos em frigorífico local. Animais de diferentes raças, faixas de peso e idade foram utilizados neste estudo. Bulbos oculares frescos foram submetidos ao debridamento da camada epitelial da córnea, sendo posteriormente imersos em solução de dextran a 25%. Mensurações da paquimetria corneal em regiões central, superior, inferior, nasal e temporal foram realizadas em cada etapa do preparo das amostras. Após 24 horas submersas em solução de dextran, as córneas foram excisadas em fragmentos de aproximadamente 3 x 3 mm, conforme as regiões acima descritas. Tais fragmentos foram submetidos à avaliação pelo microscópio de força atômica, imersos em solução de dextran a 25%. Os valores do módulo de Young para cada fragmento foram obtidos com base no modelo de elasticidade de Hertz. O armazenamento de amostras de córnea em solução de dextran preveniu a hidratação excessiva destas, mantendo a paquimetria dentro dos valores considerados normais. Tanto a paquimetria quanto o módulo de elasticidade corneais não variaram dentre as regiões central, superior, inferior, nasal e temporal da córnea. A espessura e a

elasticidade da córnea não diferiram frente à comparação de olhos contralaterais. Devido à facilidade de aquisição e aos resultados obtidos, a córnea suína pode ser empregada como modelo experimental na avaliação das propriedades biomecânicas corneais.

Palavras-chave: Córnea. Biomecânica. Elasticidade. Paquimetria. Suíno. Microscopia de força atômica.

ABSTRACT

LEANDRO, D. C. **Biomechanical analysis of porcine corneas using atomic force microscopy**. [Avaliação biomecânica de córneas de suínos por meio da microscopia de força atômica]. 2011. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Currently, the assessment of corneal biomechanical properties has been considered an important parameter to be determined, since it is related to several procedures (diagnostic and surgical) and ocular diseases. Due to the complex arrangement of its lamellae, the corneal stroma is considered the layer that exerts more influence on the elastic properties of the cornea. The demand for experimental models to study the biomechanical properties of the cornea has recently increased due to the difficulty in obtaining samples of human cornea for scientific purposes. Therefore, comparative studies between human and porcine cornea have been developed, and some similarities were identified between these two species. This study aims to evaluate the biomechanical properties of different regions of the porcine cornea using atomic force microscopy. Sixteen eyes, enucleated from eight animals, were purchased at a local slaughterhouse. Animals of different breeds, age and weight ranges were used in this study. Fresh eyeballs underwent debridement of the corneal epithelial layer, and subsequently immersed in 25% dextran solution. Measurements of corneal pachymetry in the central, superior, inferior, nasal, and temporal regions were performed at each stage of sample preparation. After 24 hours submerged in dextran solution, the corneas were excised into fragments of approximately 3 x 3 mm, according to the regions described above. These fragments were analysed by atomic force microscope immersed in 25% dextran solution. The values of Young modulus for each fragment were obtained from the elasticity model of Hertz. The storage of samples in dextran solution prevented their excessive hydration, keeping the pachymetry values within normal limits. Both corneal thickness and elastic modulus did not vary among the central, superior, inferior, nasal and temporal regions of the cornea. The thickness and elasticity of the cornea did not differ between right and left eyes. Due to the facility of acquisition and the results obtained, porcine cornea can be used as experimental model for assessment of corneal biomechanical properties.

Key words: Cornea. Biomechanical. Pachymetry. Porcine. Atomic force microscopy.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Valores do módulo de Young obtidos a partir de células, tecidos e substratos rígidos.	30
Quadro 2 – Valores do módulo de elasticidade (módulo de Young) da córnea de humanos e suínos, obtidos por diferentes técnicas.	39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação esquemática ilustrando quatro possíveis arranjos de integração entre as lamelas presentes na região central da córnea e no limbo. A ilustração (a) mostra duas populações distintas de fibrilas que, na região do limbo, formam um discreto anel. Nas ilustrações (b) e (c) o colágeno presente no limbo forma uma rede de ancoragem disposta de forma tangencial (b) ou curvando-se dentro e fora do limbo (c). A ilustração (d) mostra a presença de fibras interligadas na periferia da córnea, formando um anel na região do limbo.....33
- Figura 2 – Representação esquemática dos componentes do microscópio de força atômica42
- Figura 3 – Representação esquemática da relação entre o formato da ponta e a resolução da imagem. Note que, quando empregadas pontas abauladas e maiores, a imagem obtida é ampliada e seus limites se tornam distorcidos (A). Pontas que apresentam extremidade delgada e menor ângulo de cone produzem imagens com maior resolução (B)43
- Figura 4 – Representação esquemática dos modos de varredura de contato intermitente (a) e de contato (b).....45
- Figura 5 – Representação esquemática de curvas força-distância em uma amostra rígida (b) e em uma amostra macia (c). A ilustração (a) mostra uma situação onde não há contato estabelecido entre a ponta e a amostra. Na ilustração (b), o contato da ponta a uma superfície rígida promove a deflexão do *cantilever*. A ilustração (c) mostra a deformação de uma amostra macia, resultante do contato com a ponta, fazendo com que haja um desvio da relação linear entre a força e a distância. A diferença entre as duas curvas se refere à medida da indentação47
- Figura 6 – Representação fotográfica da higienização de bulbo ocular suíno em solução salina estéril (NaCl 0,9%).52
- Figura 7 – Representação esquemática das regiões da córnea analisadas. As regiões central (C), superior (S), inferior (I), nasal (N) e temporal

(T) foram avaliadas em bulbos oculares direito (A) e esquerdo (B).	53
Figura 8 – Representação fotográfica da mensuração da espessura corneana utilizando paquímetro ultrassônico (PachPen®, Accutome, EUA).	53
Figura 9 – Representação fotográfica, em detalhe, do procedimento de paquimetria ultrassônica.	54
Figura 10 – Representação fotográfica do processo de debridamento da camada epitelial da córnea.	54
Figura 11 – Representação fotográfica de bulbo ocular esquerdo, destacando a presença de ponto simples separado em região de limbo, adjacente ao limite superior da córnea.	55
Figura 12 – Representação fotográfica de fragmento de córnea posicionado sobre a superfície do micrômetro de precisão (Digimess®, Brasil).	56
Figura 13 – Representação fotográfica da mensuração de espessura do fragmento utilizando micrômetro de precisão (Digimess®, Brasil).	56
Figura 14 – Representação fotográfica de fragmento de córnea aderido à lamínula de vidro, por meio da utilização de adesivo cirúrgico (Vetbond®, 3M, EUA).	57
Figura 15 – Representação fotográfica do microscópio de força atômica PicoSPM-1 (Molecular Imaging/Agilent, EUA).	58
Figura 16 – Representação fotográfica dos sistemas controladores PicoScan 2100 (Molecular Imaging/Agilent, EUA) e MAC Mode Controller (Molecular Imaging/Agilent, EUA), associado a um computador pessoal contendo software específico do equipamento.	58
Figura 17 – Representação fotográfica de recipiente contendo os <i>chips</i> utilizados na análise das amostras. Destaque – <i>chip</i> suporte contendo <i>cantilever</i> e ponta.	59
Figura 18 – Representação fotográfica, em detalhe, do <i>chip</i> suporte contendo <i>cantilever</i> e ponta. Destaque – localização do <i>cantilever</i> e da ponta.	59

Figura 19 – Representação fotográfica do <i>chip</i> suporte (destaque), acoplado ao sistema de varredura do microscópio.	60
Figura 20 – Representação fotográfica de célula líquida (destaque) preenchida com solução de dextran a 25%, contendo lamínula com amostra aderida.	61
Figura 21 – Representação fotográfica, em detalhe, de célula líquida preenchida com solução de dextran a 25%, contendo lamínula com amostra aderida (destaque).	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Representação gráfica das médias de paquimetria inicial em cada região da córnea avaliada	63
Gráfico 2 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-debridamento em cada região da córnea avaliada.....	64
Gráfico 3 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-dextran em cada região da córnea avaliada	65
Gráfico 4 – Representação gráfica das médias de micrometria em cada região da córnea avaliada	66
Gráfico 5 – Representação gráfica das médias do módulo de elasticidade em cada região da córnea avaliada	67
Gráfico 6 - Representação gráfica das médias de cada medida de paquimetria	68
Gráfico 7 – Representação gráfica das médias de paquimetria inicial, realizada em região central da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	70
Gráfico 8 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-debridamento, realizada em região central da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	71
Gráfico 9 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-dextran, realizada em região central da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	72
Gráfico 10 – Representação gráfica das médias da micrometria, realizada em fragmento central da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	73
Gráfico 11 – Representação gráfica das médias do módulo de elasticidade da região central da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)	74
Gráfico 12 – Representação gráfica das médias de paquimetria inicial, realizada em região superior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	75

Gráfico 13 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-debridamento, realizada em região superior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	76
Gráfico 14 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-dextran, realizada em região superior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	77
Gráfico 15 – Representação gráfica das médias da micrometria, realizada em fragmento superior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	78
Gráfico 16 – Representação gráfica das médias do módulo de elasticidade da região superior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)	79
Gráfico 17 – Representação gráfica das médias de paquimetria inicial, realizada em região inferior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	80
Gráfico 18 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-debridamento, realizada em região inferior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	81
Gráfico 19 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-dextran, realizada em região inferior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	82
Gráfico 20 – Representação gráfica das médias da micrometria, realizada em fragmento inferior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	83
Gráfico 21 – Representação gráfica das médias do módulo de elasticidade da região inferior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)	84
Gráfico 22 – Representação gráfica das médias de paquimetria inicial, realizada em região nasal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	85
Gráfico 23 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-debridamento, realizada em região nasal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)	86

Gráfico 24 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-dextran, realizada em região nasal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	87
Gráfico 25 – Representação gráfica das médias da micrometria, realizada em fragmento nasal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)	88
Gráfico 26 – Representação gráfica das médias do módulo de elasticidade da região nasal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)	89
Gráfico 27 – Representação gráfica das médias de paquimetria inicial, realizada em região temporal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	90
Gráfico 28 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-debridamento, realizada em região temporal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	91
Gráfico 29 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-dextran, realizada em região temporal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	92
Gráfico 30 – Representação gráfica das médias da micrometria, realizada em fragmento temporal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E).....	93
Gráfico 31 - Representação gráfica das médias do módulo de elasticidade da região temporal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria inicial, para cada região da córnea - São Paulo - 2010	63
Tabela 2 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-debridamento, para cada região da córnea - São Paulo - 2010.....	64
Tabela 3 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-dextran, para cada região da córnea - São Paulo - 2010.....	65
Tabela 4 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da micrometria, para cada região da córnea - São Paulo - 2010	66
Tabela 5 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo do módulo de elasticidade, para cada região da córnea - São Paulo - 2010.....	67
Tabela 6 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo das medidas de paquimetria (paquimetria inicial, paquimetria pós-debridamento, paquimetria pós-dextran e micrometria) - São Paulo - 2010.....	68
Tabela 7 – Comparações múltiplas entre as medidas de paquimetria - São Paulo - 2010	69
Tabela 8 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria inicial, realizada na região central da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	69
Tabela 9 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-debridamento, realizada na região central da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010.....	70
Tabela 10 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-dextran, realizada na região central da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	71

Tabela 11 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da micrometria, realizada em fragmento central da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	72
Tabela 12 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo do módulo de elasticidade, na região central da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	73
Tabela 13 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria inicial, realizada na região superior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	74
Tabela 14 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-debridamento, realizada na região superior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010.....	75
Tabela 15 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-dextran, realizada na região superior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	76
Tabela 16 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da micrometria, realizada em fragmento superior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	77
Tabela 17 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo do módulo de elasticidade, na região superior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	78
Tabela 18 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria inicial, realizada na região inferior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	79
Tabela 19 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-debridamento, realizada na região inferior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010.....	80
Tabela 20 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-dextran, realizada na região inferior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	81

Tabela 21 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da micrometria, realizada em fragmento inferior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	82
Tabela 22 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo do módulo de elasticidade, na região inferior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	83
Tabela 23 - Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria inicial, realizada na região nasal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	84
Tabela 24 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-debridamento, realizada na região nasal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010.....	85
Tabela 25 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-dextran, realizada na região nasal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	86
Tabela 26 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da micrometria, realizada em fragmento nasal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	87
Tabela 27 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo do módulo de elasticidade, na região nasal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	88
Tabela 28 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria inicial, realizada na região temporal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	89
Tabela 29 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-debridamento, realizada na região temporal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010.....	90
Tabela 30 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-dextran, realizada na região temporal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	91

Tabela 31 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da micrometria, realizada em fragmento temporal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	92
Tabela 32 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo do módulo de elasticidade, na região temporal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	microscopia de força atômica
ATP	adenosina trifosfato
D	direito
E	esquerdo
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
LASIK	laser in situ keratomileusis
psi	libra-força por polegada quadrada
PBS	solução tampão fosfato
Pós-debr.	pós-debridamento
PRK	ceratectomia fotorrefrativa

LISTA DE SÍMBOLOS

Pa	pascal
N	newton
m	metro
kPa	quilopascal
MPa	megapascal
GPa	gigapascal
kgf	quilograma-força
cm	centímetro
lb	libra
in	polegada
nm	nanômetro
mm	milímetro
μm	micrômetro
pN	piconewton
F	força aplicada pelo <i>cantilever</i>
k	constante de mola
d	deflexão do <i>cantilever</i>
μl	microlitro
R	raio
h	profundidade de indentação
ν	coeficiente de Poisson
E	módulo de elasticidade (módulo de Young)
z	deslocamento piezoelétrico
α	ângulo de face da ponta piramidal
NaCl	cloreto de sódio
da	dalton
ml	mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	ELASTICIDADE	29
2.2	CÓRNEA.....	31
2.2.1	Anatomia da córnea.....	31
2.2.2	Fisiologia da córnea.....	35
2.2.3	Propriedades biomecânicas da córnea.....	36
2.3	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)	40
2.3.1	Histórico.....	40
2.3.2	Mecanismo	41
2.3.2.1	Equipamento	41
2.3.2.2	Modos de varredura.....	43
2.3.2.3	Preparo da amostra	47
2.3.2.4	Análise das imagens e dos dados.....	48
2.3.3	Uso da AFM na avaliação da córnea.....	50
3	OBJETIVO	51
4	MATERIAL E MÉTODO.....	52
4.1	OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS	52
4.2	ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	57
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
5	RESULTADOS.....	63
5.1	COMPARAÇÃO ENTRE AS REGIÕES DA CÓRNEA.....	63
5.1.1	Paquimetria inicial.....	63
5.1.2	Paquimetria pós-debridamento.....	64
5.1.3	Paquimetria pós-dextran.....	65
5.1.4	Micrometria.....	66
5.1.5	Módulo de elasticidade	67
5.2	COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIDAS DE PAQUIMETRIA.....	68
5.3	COMPARAÇÃO ENTRE OS OLHOS DIREITOS E ESQUERDOS.....	69
5.3.1	Região central.....	69
5.3.2	Região superior	74
5.3.3	Região inferior	79

5.3.4	Região nasal.....	84
5.3.5	Região temporal	89
6	DISCUSSÃO	95
7	CONCLUSÕES.....	100
	REFERÊNCIAS.....	101

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a avaliação das propriedades biomecânicas da córnea vem sendo considerada um parâmetro importante a ser determinado, uma vez que está relacionado a diversos procedimentos (diagnósticos e cirúrgicos) e oftalmopatias.

As alterações biomecânicas da córnea podem alterar os resultados obtidos na tonometria por aplanção (LIU; ROBERTS, 2005; HAMILTON; PYE, 2008; TOUBOUL et al., 2008), o poder dióptrico da córnea (HJORTDAL, 1996), e podem ainda estar relacionadas a complicações pós-operatórias em cirurgias refrativas e facoemulsificação (ROBERTS, 2002; ORTIZ et al., 2007; CHEN et al., 2008; KUCUMEN et al., 2008; KAMIYA; SHIMIZU; OHMOTO, 2009; ALIÓ et al., 2010). Doenças como o *diabetes mellitus* e o ceratocone podem alterar significativamente os parâmetros biomecânicos corneais (ANDREASSEN; SIMONSEN; OXLUND, 1980; MEEK et al., 2005; GEFEN et al., 2009; GOLDICH et al., 2009; HAGER; WEGSCHEIDER; WIEGAND, 2009).

Devido à complexa disposição de suas lamelas, o estroma corneal é considerado a camada que exerce maior influência sobre as propriedades elásticas da córnea (HJORTDAL, 1996). Estudos realizados por meio da microscopia eletrônica de varredura e difração de raios-x identificaram padrões de organização das fibrilas colágenas e constataram que, o módulo de elasticidade das fibras, associado ao volume e orientação destas, determinam as características mecânicas locais da córnea (MEEK et al., 1987; KOMAI; USHIKI, 1991; NEWTON; MEEK, 1998; BOOTE et al., 2003; MEEK; BOOTE, 2004; BOOTE et al., 2005; BOOTE et al., 2006).

A busca por modelos experimentais no estudo das propriedades biomecânicas da córnea têm aumentado ultimamente, devido à dificuldade em se obter amostras de córnea humana para fins científicos. Logo, estudos comparativos entre a córnea humana e a suína vêm sendo desenvolvidos, e algumas similaridades foram identificadas entre estas duas espécies (KAMPMEIER et al., 2000; ZENG et al., 2001; ASEJCZYK-WIDLICKA; PIERSCIONEK, 2008; ELSHEIKH; ALHASSO; RAMA, 2008b).

A microscopia de força atômica (AFM), desenvolvida em 1986, tem sido utilizada atualmente em medicina devido à imagem de alta resolução obtida, a qual

confere avanços na avaliação da morfologia e topografia de células, microorganismos e, inclusive, moléculas (PAROT et al., 2007).

Entretanto, somente a partir de 1993, a AFM passou a explorar a elasticidade celular em nanoescala, trazendo informações complementares àquelas obtidas por outras técnicas. Propriedades biomecânicas de uma grande variedade de células como plaquetas, macrófagos, fibroblastos, osteoblastos, e células epiteliais, endoteliais, miocárdicas e da glia já foram mensuradas com base na AFM (PAROT et al., 2007).

Alguns estudos, voltados à pesquisa da ultraestrutura corneal e escleral foram publicados, nos quais são avaliados não somente a organização das fibras colágenas e suas interações com os proteoglicanos, como também o conteúdo dos espaços interfibrilares (MELLER; PETERS; MELLER, 1997; YAMAMOTO et al., 1997; MIYAGAWA et al., 2001; YAMAMOTO et al., 2002).

Outros experimentos, inclusive, foram capazes de produzir imagens de alta-resolução da superfície endotelial posterior na córnea de coelhos (LYDATAKI et al., 2003). A avaliação da superfície epitelial corneal também foi possibilitada por meio da AFM, fornecendo imagens de ótima resolução e magnificação (TSILIMBARIS et al., 2000).

As propriedades mecânicas das membranas basais da córnea também foram avaliadas em estudo recente, por meio da microscopia de força atômica (LAST et al., 2009).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ELASTICIDADE

Quando um grande número de átomos se une para formar um sólido, estes são mantidos juntos por meio de forças interatômicas. Tais ligações podem ser rígidas ou flexíveis, conferindo a cada material o seu grau de elasticidade (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 1996).

Segundo a lei de Hooke, para cada tipo de deformação existe uma tensão atuante, a qual é caracterizada pela intensidade das forças aplicadas sobre um material por unidade de área (YOUNG; FREEDMAN, 2008). As tensões e deformações podem ser consideradas diretamente proporcionais, dependendo do material (VINCKIER; SEMENZA, 1998). Tal constante de proporcionalidade é denominada módulo de elasticidade, de forma que podemos descrever:

$$\text{tensão} = \text{módulo de elasticidade} \times \text{deformação}$$

dado que, quanto maior o módulo de elasticidade, mais rígido é o material (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 1996).

Nos casos de tração ou compressão simples, a tensão é definida como a força deformante dividida pela área sobre a qual ela atua, uma vez que a força aplicada é perpendicular à área. A deformação, por sua vez, corresponde à alteração fracionária ou percentual no comprimento da amostra, sendo caracterizada por uma grandeza adimensional (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 1996).

No sistema internacional de unidades, a tensão é expressa pela unidade de pressão Pascal (Pa), que corresponde à carga de 1 N atuando sobre uma superfície de 1m^2 . Ou seja, $\text{Pa} = \text{N}/\text{m}^2$. Como a unidade Pascal é muito pequena, utiliza-se frequentemente os seus múltiplos, como kPa ($\text{Pa} \times 10^3$), MPa ($\text{Pa} \times 10^6$) e GPa ($\text{Pa} \times 10^9$). Em outros sistemas de unidades, a tensão ainda pode ser expressa em quilograma-força por centímetro quadrado (kgf/cm^2) e libra por polegada quadrada (lb/in^2 ou psi) (YOUNG; FREEDMAN, 2008). Como a deformação é adimensional, o módulo de elasticidade apresenta as mesmas dimensões da tensão, ou seja, força por unidade de área (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 1996).

O módulo de elasticidade para as tensões de tração e compressão é denominado módulo de Young (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 1996). O quadro disposto abaixo mostra os valores do módulo de Young de diferentes materiais, incluindo tecidos, células e substratos rígidos comumente utilizados (Quadro 1).

Material	Módulo de Young (Pa)	Referência
Vidro	5×10^{10}	(WEISENHORN et al., 1993)
Mica	$2 - 8 \times 10^{10}$	(HEUBERGER; DIETLER; SCHLAPBACH, 1996)
Neutrófilos	156 ± 87	(ROSENBLUTH; LAM; FLETCHER, 2006)
Osteoblastos	$0,003 - 2 \times 10^5$	(SIMON et al., 2003)
Astrócitos	$0,2 - 2 \times 10^4$	(YAMANE et al., 2000)
Fibroblastos	$4 - 5 \times 10^3$	(BUSHELL et al., 1999)
Plaquetas	$0,1 - 5 \times 10^4$	(RADMACHER et al., 1996)
Eritrócitos	$1,9 - 3,3 \times 10^4$	(DULINSKA et al., 2006)
Colágeno	$5 - 11,5 \times 10^9$	(WENGER et al., 2007)
Cartilagem	$1,6 - 6 \times 10^5$	(WEISENHORN et al., 1993)

Quadro 1 – Valores do módulo de Young obtidos a partir de células, tecidos e substratos rígidos

Os efeitos resultantes da aplicação de uma determinada força a um material dependem tanto das condições físicas presentes no momento da deformação, quanto da composição e propriedades mecânicas do material em questão (YOUNG; FREEDMAN, 2008).

Uma deformação é considerada elástica nos casos em que o material retorna ao seu estado anterior (não-deformado), uma vez cessadas as tensões aplicadas sobre este. Logo, no comportamento elástico, a deformação é diretamente proporcional à tensão. Nas deformações viscosas, entretanto, o material não recupera seu estado anterior após interrompida a aplicação da força. Nestes casos, a deformação é dita “permanente”, e quanto maior a tensão aplicada, mais rapidamente o material se deforma. Portanto, a deformação total depende tanto da

intensidade da tensão, quanto do tempo de sua aplicação. Alguns materiais podem ainda exibir um comportamento viscoelástico, caracterizado pela recuperação retardada do estado não-deformado, uma vez cessadas as forças aplicadas (YOUNG; FREEDMAN, 2008).

Quando um objeto é tracionado, seu alongamento axial é acompanhado por uma contração lateral. De forma contrária, quando um objeto é submetido à compressão, sua largura aumenta. A relação entre tais deformações (transversal e longitudinal) é constante em materiais de comportamento elástico, sendo denominada coeficiente de Poisson. Os materiais isotrópicos são aqueles que apresentam as mesmas propriedades elásticas em qualquer direção que a tensão for aplicada. Os anisotrópicos, entretanto, não possuem esta simetria elástica (YOUNG; FREEDMAN, 2008).

2.2 CÓRNEA

A córnea é uma estrutura transparente, e constitui parte da túnica fibrosa do bulbo ocular. Além de oferecer suporte às demais estruturas intraoculares, permite a refração e transmissão da luz, devido à sua curvatura e transparência características. Sua transparência se deve a determinados fatores anatômicos, tais como: ausência de vascularização, presença de epitélio não-queratinizado e ausência de pigmentação, além da dimensão e organização uniforme das fibras colágenas estromais. Por se tratar de uma estrutura avascular, a nutrição proveniente da vascularização límbica, do filme lacrimal e do humor aquoso se dá por difusão célula a célula (SAMUELSON, 2007).

2.2.1 Anatomia da córnea

Na maior parte das espécies animais, a córnea é constituída por quatro camadas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (SAMUELSON, 2007). Atualmente, alguns autores consideram ainda o filme lacrimal pertencente a estas (SLATTER, 2001). Em aves e primatas há, adicionalmente, a membrana de Bowman, a qual se localiza entre o epitélio e estroma corneais (SAMUELSON, 1991). Esta membrana é descrita, por muitos autores, como uma condensação acelular do estroma anterior da córnea. Alguns autores ainda sugerem que a

camada epitelial esteja envolvida em seu desenvolvimento. Em humanos, a membrana de Bowman é constituída por um aglomerado desorganizado de fibrilas colágenas, formando uma camada densa de fibras dos tipos I, III e IV (WILSON; HONG, 2000). Todas estas camadas atuam em conjunto de forma a manter adequada a estrutura e o metabolismo corneais (SAMUELSON, 2007).

A camada epitelial compreende a superfície anterior da córnea, sendo constituída por várias camadas de células escamosas e colunares, apoiadas sobre uma membrana basal. Esta porção da córnea possui inervação exuberante e atua como barreira, possibilitando a ocorrência de trocas metabólicas com o filme lacrimal (SAMUELSON, 2007).

O estroma corneal é constituído por fibras colágenas dispostas de maneira organizada, conferindo transparência e resistência mecânica à córnea. As fibras colágenas mais comuns presentes no estroma são as do tipo I. As fibras dos tipos V e VI também são observadas, em menor quantidade, associadas à matriz interfibrilar. Poucas células, denominadas ceratócitos, encontram-se entremeadas em meio às fibras, sendo responsáveis pela produção da matriz extracelular. As glicosaminoglicanas (queratan-sulfato, dermatan-sulfato, sulfato de condroitina, ácido hialurônico e heparina) se distribuem de forma homogênea nesta camada e se ligam a proteínas, formando os proteoglicanos, responsáveis por manter fixo o arranjo fibrilar (SAMUELSON, 2007).

Muitos estudos têm se baseado em variadas técnicas, como a microscopia eletrônica de varredura e a difração de raios-x, com o intuito de avaliar a orientação das lamelas estromais e a fusão de suas fibrilas às fibras colágenas presentes no limbo (KOMAI; USHIKI, 1991; NEWTON; MEEK, 1998; BOOTE et al., 2003; MEEK; BOOTE, 2004; BOOTE et al., 2006).

Por meio da microscopia eletrônica de varredura, constatou-se que o diâmetro das fibrilas colágenas permanece constante em todas as regiões da córnea humana, variando entre 25 e 35 nm. Entretanto, observou-se que o arranjo das lamelas colágenas varia dentre as regiões anterior e posterior da córnea. As lamelas presentes na região anterior da córnea se encontram dispostas em direções aleatórias e, frequentemente, se ramificam e se interligam de forma irregular. As lamelas da região posterior, entretanto, encontram-se sobrepostas umas às outras, paralelamente à superfície corneal (KOMAI; USHIKI, 1991).

Em estudo realizado utilizando a difração de raios-x, concluiu-se que a maior parte das fibrilas colágenas presentes na região central da córnea humana se orienta nas direções inferior-superior e nasal-temporal (MEEK et al., 1987). Estudo posterior, também conduzido em córneas humanas, caracterizou uma disposição circunferencial das fibras na periferia e na região do limbo (Figura 1). Entretanto, esta orientação não apresentou uniformidade, podendo variar em largura, angulação e densidade (NEWTON; MEEK, 1998).

Fonte: MEEK; BOOTE, 2004.

Figura 1 – Representação esquemática ilustrando quatro possíveis arranjos de integração entre as lamelas presentes na região central da córnea e no limbo. A ilustração (a) mostra duas populações distintas de fibrilas que, na região do limbo, formam um discreto anel. Nas ilustrações (b) e (c) o colágeno presente no limbo forma uma rede de ancoragem disposta de forma tangencial (b) ou curvando-se dentro e fora do limbo (c). A ilustração (d) mostra a presença de fibras interligadas na periferia da córnea, formando um anel na região do limbo

Recentemente, constatou-se que o diâmetro das fibrilas estromais não varia dentre as diferentes regiões da córnea humana (com exceção do limbo), assim como o espaço interfibrilar. Entretanto, estas se encontram mais compactadas na

região central da córnea, se comparadas às fibrilas presentes na periferia (BOOTE et al., 2003).

Alguns autores confirmaram ainda que, em humanos, a disposição das fibras colágenas difere entre os olhos direito e esquerdo, embora seja mantida uma simetria com relação à linha média do corpo (BOOTE et al., 2006).

A membrana de Descemet, localizada entre o estroma e o endotélio corneais, é uma estrutura acelular bastante elástica, devido à presença de delgadas fibras colágenas (SAMUELSON, 2007). Além das fibras colágenas do tipo IV, esta membrana é formada ainda por filamentos de fibras do tipo III, organizados de forma entrelaçada e hexagonal, formando nós nos locais de ramificação. As fibras de colágeno do tipo III também conferem porosidade a esta estrutura, exercendo desta forma um papel importante na resistência e hidratação corneais, além de oferecer manutenção necessária ao endotélio após traumas cirúrgicos. Alguns autores especulam ainda sobre determinadas funções de suporte mecânico, filtração, e barreira a substâncias fluidas (DANIELSEN, 2004).

O endotélio, por sua vez, é constituído por uma camada única de células, as quais apresentam pouca capacidade de renovação. Esta camada permite a passagem de elementos nutritivos do humor aquoso e mantém o estado de deturgescência do estroma, por meio das bombas de sódio e potássio (SAMUELSON, 2007).

A córnea apresenta forma elíptica, porém seus diâmetros horizontal e vertical variam conforme a espécie. Nos cães e gatos, tais medidas são bastante similares, conferindo à córnea destes animais um formato circular (SAMUELSON, 2007). Entretanto, a córnea dos animais da espécie suína possui formato ovalado e assimétrico, apresentando contorno cônico em sua porção nasal. Seu diâmetro horizontal varia entre 14,0 e 15,5 mm (média de $14,9 \pm 0,5$ mm), e seu diâmetro vertical se aproxima de 11,0 a 13,0 mm (média de $12,4 \pm 0,7$ mm) (FABER et al., 2008).

A espessura corneal também varia de acordo com a espécie, raça ou característica individual, apresentando-se mais delgada em sua porção central, e mais espessa em sua periferia. Em estudos que avaliaram a paquimetria central de olhos suínos enucleados, valores entre 760 e 1.460 μm (média de 980 μm) (BARTHOLOMEW et al., 1997), e entre 600 e 700 μm (BÖHNKE et al., 1998) foram obtidos. Um destes estudos, inclusive, demonstrou que a espessura corneal

periférica apresenta valores maiores que a região central (BARTHOLOMEW et al., 1997). Estudo recente, conduzido em suínos *in vivo*, avaliou a espessura das regiões central, superior, inferior, nasal e temporal, por meio da paquimetria ultrassônica. A região central da córnea apresentou espessura média de 666 μm , a superior 714 μm , a inferior 713 μm , a nasal 657 μm e a porção temporal 669 μm . Neste estudo, foram observados valores similares ao longo do eixo horizontal da córnea, com relação à maior espessura mensurada nas porções superior e inferior. Algumas variações foram consideradas, pelos autores, inerentes à raça, sexo e idade do animal, embora não haja comprovação científica desta hipótese (FABER et al., 2008). Vale ressaltar que os estudos citados empregaram diferentes técnicas para a mensuração da espessura corneal, como a paquimetria ultrassônica (FABER et al., 2008), a biomicroscopia ultrassônica (BARTHOLOMEW et al., 1997) e a reflectometria óptica (BÖHNKE et al., 1998).

Estudos conduzidos em humanos, utilizando a tomografia de coerência óptica (OCT) e o topógrafo Orbscan® (Bausch & Lomb, EUA), constataram que a espessura corneal é maior nas regiões superior e temporal, se comparada às regiões inferiores. Os autores concluíram que esta diferença se deve ao efeito hipóxico crônico produzido pela pálpebra superior, atuando sobre a porção superior da córnea (LIU; HUANG; PFLUGFELDER, 1999; LIU; PFLUGFELDER, 2000; HAQUE; JONES; SIMPSON, 2008). Demais estudos realizados em humanos constataram ainda que não existe diferença, com relação à espessura corneana central, entre os olhos direitos e esquerdos (NISSEN et al., 1991; WOLFS et al., 1997; WONG et al., 2002).

2.2.2 Fisiologia da córnea

A sensibilidade da córnea é o maior fator de proteção da superfície ocular. A oclusão das pálpebras, associada à retração do bulbo ocular e ao prolapso da terceira pálpebra, são os reflexos fundamentais desencadeados quando a córnea é tocada ou lesionada (GUM; GELATT; ESSON, 2007).

A córnea é innervada pelos nervos ciliares longos, os quais emergem do ramo oftálmico do nervo trigêmeo e se ramificam em inúmeras terminações sensitivas, presentes dentre as camadas de células epiteliais. Tais terminações, por sua vez, conferem sensibilidade a esta estrutura, fator que contribui com sua proteção. Os

nociceptores se dispõem nas camadas epiteliais mais superficiais, enquanto os receptores sensíveis à pressão se distribuem no estroma corneal (SAMUELSON, 2007).

Juntamente com a esclera, a córnea é responsável por manter a forma do bulbo ocular e a pressão intraocular. A córnea se encontra associada ao filme lacrimal, humor aquoso, pressão intraocular e pálpebras. Logo, qualquer alteração nestas estruturas pode provocar danos à córnea, levando à perda de transparência e consequente perda da visão (GUM; GELATT; ESSON, 2007).

Uma vez que a córnea é a estrutura de maior poder refrativo do bulbo ocular, esta deve se manter transparente para que ocorra transmissão da luz. Sua transparência se deve à sua relativa acelularidade, ausência de vascularização e pigmentação, arranjo uniforme das fibras colágenas e matriz extracelular estromais, e pelo seu constante estado de deturgescência (GUM; GELATT; ESSON, 2007).

O humor aquoso, os capilares limbares e o filme lacrimal fornecem os nutrientes necessários à córnea, uma vez que esta se trata de uma estrutura avascular. Com a finalidade de manter seu relativo estado de desidratação, a córnea é nutrida por meio de moléculas de glicose obtidas do humor aquoso, as quais, após o processo de glicólise, fornecem energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). O epitélio corneal adquire oxigênio por meio de um processo de glicólise aeróbica, que ocorre no filme lacrimal. O endotélio e os ceratócitos presentes no estroma posterior recebem oxigênio por meio de interações com o humor aquoso. A glicose também é fornecida pelos capilares limbares e pelo filme lacrimal. Esta, por sua vez, é armazenada no epitélio corneal na forma de glicogênio, o qual é utilizado caso haja necessidade. O endotélio requer elevadas concentrações de glicose, a fim de suprir a atividade metabólica das bombas de sódio-potássio (GUM; GELATT; ESSON, 2007).

2.2.3 Propriedades biomecânicas da córnea

As propriedades biomecânicas da córnea se encontram intimamente relacionadas à sua estrutura, com especial envolvimento de seu estroma (HJORTDAL, 1996). Sua elasticidade depende basicamente do arranjo estabelecido pelas fibras colágenas, e varia conforme a direção e região em que a variável é mensurada (KOTECHA, 2007). Atualmente, sabe-se que o epitélio e as demais

membranas, como a de Descemet e a membrana de Bowman, exercem mínimo efeito sobre as características mecânicas da córnea (SEILER et al., 1992; ELSHEIKH; ALHASSO; RAMA, 2008a)

Estudos recentes, utilizando técnicas como a difração de raios-x, constataram que o módulo de elasticidade das fibras, associado ao volume e orientação destas, determinam as características mecânicas locais da córnea (BOOTE et al., 2005).

Estudos *ex vivo* têm demonstrado que a córnea humana apresenta comportamento elástico não-linear, uma vez que seu módulo de elasticidade (módulo de Young) aumenta na medida em que aumenta a tensão aplicada (HJORTDAL, 1996). Além disso, o módulo de elasticidade da córnea varia direcionalmente e regionalmente. Elevados módulos de elasticidade são observados meridionalmente, em regiões centrais e paracentrais da córnea, e circunferencialmente, próximo ao limbo (HJORTDAL, 1998).

Fatores como paquimetria e hidratação são considerados limitantes quando se deseja avaliar as propriedades biomecânicas da córnea. Estudos conduzidos em pacientes humanos normais e portadores de ceratocone demonstraram que as córneas mais espessas apresentam maior rigidez (EDMUND, 1988; TOUBOUL et al., 2008). Com relação à hidratação, estudos concluíram que córneas normalmente hidratadas são mais rígidas que as edemaciadas (HJORTDAL, 1995; HENNIGHAUSEN et al., 1998).

A idade também exerce papel importante sobre a elasticidade da córnea. Em humanos, conforme há o aumento da idade, as fibrilas corneanas se tornam mais espessas devido à deposição contínua de colágeno (DAXER et al., 1998). Logo, a córnea se torna mais rígida com o passar da idade (ELSHEIKH et al., 2007).

As propriedades mecânicas da córnea influenciam de maneira importante o seu poder refrativo, uma vez que são responsáveis pela manutenção de sua forma (HJORTDAL, 1996). Logo, conhecer as características biomecânicas da córnea é fundamental para o entendimento do comportamento desta estrutura frente a cirurgias refrativas (SHIN et al., 1997). Diversos estudos também demonstraram que variações na elasticidade da córnea humana podem produzir erros na mensuração da pressão intraocular (LIU; ROBERTS, 2005; HAMILTON; PYE, 2008; TOUBOUL et al., 2008).

Atualmente, a avaliação das propriedades biomecânicas da córnea vem sendo considerada um parâmetro importante a ser determinado, uma vez que está

relacionado a diversos procedimentos cirúrgicos e oftalmopatias (ANDREASSEN; SIMONSEN; OXLUND, 1980; ROBERTS, 2002; MEEK et al., 2005; ORTIZ et al., 2007; CHEN et al., 2008; KUCUMEN et al., 2008; GEFEN et al., 2009; GOLDICH et al., 2009; HAGER; WEGSCHEIDER; WIEGAND, 2009; KAMIYA; SHIMIZU; OHMOTO, 2009; ALIÓ et al., 2010).

Estudos comprovaram que as propriedades biomecânicas da córnea podem ser alteradas após a realização de cirurgias refrativas, comprometendo os resultados no período pós-operatório (HJORTDAL, 1998; ROBERTS, 2002; ORTIZ et al., 2007; CHEN et al., 2008; KAMIYA; SHIMIZU; OHMOTO, 2009). Autores ainda sugerem que a técnica LASIK (*laser in situ keratomileusis*) produz mais alterações biomecânicas em córnea que a técnica PRK (ceratectomia fotorrefrativa) (KAMIYA; SHIMIZU; OHMOTO, 2009). Estudos recentes também relacionam a facoemulsificação ao desenvolvimento de anormalidades biomecânicas corneais no período pós-operatório (KUCUMEN et al., 2008; ALIÓ et al., 2010).

Doenças como o *diabetes mellitus* e o ceratocone podem alterar significativamente os parâmetros biomecânicos corneais. Estudos constataram um aumento significativo da paquimetria e rigidez em pacientes humanos diabéticos, decorrentes de importantes modificações nas fibras colágenas e nos proteoglicanos (GOLDICH et al., 2009; HAGER; WEGSCHEIDER; WIEGAND, 2009).

Estudos conduzidos em pacientes humanos portadores de ceratocone demonstraram alterações importantes nas propriedades elásticas corneais. A córnea destes pacientes, se comparados aos indivíduos normais, apresenta menor resistência, devido à presença de anormalidades na organização das lamelas e à sua reduzida espessura (ANDREASSEN; SIMONSEN; OXLUND, 1980; MEEK et al., 2005; GEFEN et al., 2009).

A comparação entre as características mecânicas de córneas humanas e suínas têm sido amplamente exploradas em literatura científica, devido à grande dificuldade em se obter amostras de córnea humana para fins experimentais (KAMPMEIER et al., 2000; ZENG et al., 2001; ASEJCZYK-WIDLICKA; PIERSCIONEK, 2008; ELSHEIKH; ALHASSO; RAMA, 2008b). Os valores do módulo de elasticidade da córnea de diferentes espécies variam bastante dentre os estudos realizados (0,05 – 27,5 MPa), possivelmente devido às diferentes formas de preparo das amostras ou técnicas adotadas (Quadro 2).

Apesar da ampla variedade de valores, tanto para a córnea humana quanto para a suína, alguns estudos identificaram similaridades – com relação às propriedades biomecânicas – entre as duas espécies, permitindo a utilização da córnea suína como modelo experimental (ZENG et al., 2001; ELSHEIKH; ALHASSO; RAMA, 2008b).

Espécie	Módulo de elasticidade (MPa)	Referência
Suína	0,4 – 3	(KAMPMEIER et al., 2000)
Humana	3,3 – 4,45	(ZENG et al., 2001)
Suína	3,3 – 4,0	(ZENG et al., 2001)
Suína	0,05 – 0,24	(ASEJCZYK-WIDLICKA; PIERSCIONEK, 2008)
Humana	2,76 – 27,5	(HJORTDAL, 1996)
Humana	0,13 – 0,43	(HAMILTON; PYE, 2008)
Humana	0,1 – 0,9	(LIU; ROBERTS, 2005)
Humana	3 – 20	(HJORTDAL, 1995)
Humana	0,05 – 12,0	(JAYASURIYA et al., 2003)

Quadro 2 – Valores do módulo de elasticidade (módulo de Young) da córnea de humanos e suínos, obtidos por diferentes técnicas

A mensuração das propriedades biomecânicas da córnea pode ser realizada por diferentes métodos. A extensometria uniaxial de faixas de estroma corneal é uma das técnicas mais empregadas, devido à sua simplicidade. Entretanto, uma vez que a faixa de córnea é tracionada, esta perde a sua curvatura natural, promovendo uma distribuição desigual da tensão aplicada dentre as lamelas. Logo, a córnea passa a ser testada em seu estado não-fisiológico. Os testes de inflação, por sua vez, mantém a curvatura da córnea durante todo o procedimento, fornecendo resultados mais fidedignos acerca das propriedades biomecânicas corneais (HJORTDAL, 1995; ELSHEIKH; ANDERSON, 2005).

Ambas as técnicas descritas foram empregadas nos estudos anteriormente citados. Entretanto, os testes de inflação foram mais comumente utilizados (HJORTDAL, 1995,1996; ASEJCZYK-WIDLICKA; PIERSCIONEK, 2008), se comparados à extensometria de faixa (KAMPMEIER et al., 2000; ZENG et al., 2001).

2.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM), desenvolvida em 1986, tem sido utilizada atualmente em medicina devido à imagem de alta resolução obtida, a qual confere avanços na avaliação da morfologia e topografia de células, microorganismos e, inclusive, moléculas (PAROT et al., 2007).

2.3.1 Histórico

O microscópio de força atômica foi desenvolvido em 1986 por Gerd Binnig, Calvin Quate e Christopher Gerber, a partir de uma variação do microscópio de tunelamento (BINNIG; QUATE; GERBER, 1986). Este, inventado em 1981 por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, foi o primeiro instrumento capaz de gerar imagens reais de superfícies com resolução atômica. O microscópio de tunelamento apresentava ainda maior sensibilidade e menor consumo de energia, se comparado ao microscópio eletrônico. Entretanto, esta tecnologia requeria amostras com superfícies condutoras, impossibilitando a análise de materiais biológicos (BINNIG et al., 1982).

Com o advento do microscópio de força atômica, tornou-se possível o estudo de superfícies não-condutoras, como polímeros e amostras biológicas. As primeiras amostras biológicas avaliadas por meio da AFM foram os cristais de aminoácidos, em 1988 (GOULD et al., 1988). O desenvolvimento de técnicas complementares, como o modo de contato intermitente (*tapping mode*) e em líquido, contribuiu para o emprego da AFM em estudos envolvendo materiais biológicos, uma vez que estas minimizam os danos produzidos à amostra (MARTI; DRAKE; HANSMA, 1987; DRAKE et al., 1989; ZHONG et al., 1993; HANSMA et al., 1994; PUTMAN et al., 1994).

Muitas outras aplicações foram posteriormente desenvolvidas, como a mensuração direta de interações intermoleculares, a avaliação das propriedades viscoelásticas de células e moléculas, e a elaboração de mapeamentos químicos (DUCKER; SENDEN; PASHLEY, 1991; FLORIN; MOY; GAUB, 1994; DAMMER et al., 1995; FINOT; MCDERMOTT, 1997).

2.3.2 Mecanismo

Compreender o mecanismo de funcionamento do microscópio de força atômica é fundamental para explorar sua ampla variedade de aplicações.

2.3.2.1 Equipamento

O microscópio de força atômica funciona de forma semelhante a uma agulha de toca-discos de vinil (Figura 2). É constituído por uma haste flexível (*cantilever*), na qual se acopla à sua extremidade uma ponta (*tip*), responsável pela varredura da amostra a ser analisada. O movimento da ponta sobre a amostra no plano xy é realizado por cristais piezoelétricos, e a área de varredura varia entre 50×50 e $200 \times 200 \mu\text{m}^2$. A variação de altura (eixo z), entretanto, varia entre 1 e $20 \mu\text{m}$. Logo, superfícies planas e lisas são requeridas (GADEGAARD, 2006; NAKAMURA, 2007).

Os dados obtidos pelo microscópio de força atômica resultam da interação estabelecida entre a superfície da amostra e a ponta. Esta interação corresponde às forças existentes entre os átomos presentes na amostra, e aqueles localizados na ponta que realiza a varredura (SANTOS; CASTANHO, 2004; GADEGAARD, 2006).

A varredura pode ser realizada mantendo-se uma distância constante entre a ponta e a superfície da amostra, ou mantendo constante a força existente entre ambas. Quando a distância é constante, registra-se a força repulsiva observada em cada ponto no plano xy . No outro caso, um mecanismo de *feedback* mantém a força repulsiva constante, sendo registradas as variações de altura no eixo z para cada ponto no plano xy (SHAO; YANG; SOMLYO, 1995; NAKAMURA, 2007).

O movimento do cantilever é mensurado por um feixe de laser, o qual é direcionado à face oposta do seu ápice. A luz é então refletida a um fotodetector, responsável por identificar os movimentos laterais e verticais do *cantilever* (GADEGAARD, 2006). Os dados obtidos são registrados em um computador e utilizados na elaboração de uma imagem pseudo-tridimensional da superfície da amostra, ou seja, sua topografia (SANTOS; CASTANHO, 2004).

Com a finalidade de isolar o equipamento de qualquer tipo de vibração externa, o microscópio deve sempre permanecer sobre uma superfície sólida, suspensa por cabos elásticos. Desta forma, tais vibrações são reduzidas a oscilações de baixa

frequência, que não interferem nas mensurações realizadas (SANTOS; CASTANHO, 2004).

Os *cantilevers* e as pontas podem variar em formato, dimensão e material, de acordo com a amostra a ser analisada. Os materiais mais comumente utilizados são o silício e o nitreto de silício. As pontas de silício são mais rígidas e quebradiças, sendo comumente empregadas nas varreduras em modo de contato intermitente. Os *cantilevers* de nitreto de silício são muito mais flexíveis, sendo geralmente empregados em varreduras no modo de contato e/ou em líquidos (GADEGAARD, 2006).

Fonte: NAKAMURA, 2007.

Figura 2 – Representação esquemática dos componentes do microscópio de força atômica

Outro fator importante na interação entre a amostra e a ponta é o formato desta. Quanto mais fina for a ponta, e menor o ângulo de seu cone, maior será a resolução da imagem (Figura 3) (GADEGAARD, 2006).

Fonte: Adaptado de GADEGAARD, 2006.

Figura 3 – Representação esquemática da relação entre o formato da ponta e a resolução da imagem. Note que, quando empregadas pontas abauladas e maiores, a imagem obtida é ampliada e seus limites se tornam distorcidos (A). Pontas que apresentam extremidade delgada e menor ângulo de cone produzem imagens com maior resolução (B)

2.3.2.2 Modos de varredura

Os modos de varredura do microscópio de força atômica também variam. O modo de contato é a versão original da AFM, na qual a ponta estabelece contato constante com a amostra. A ponta do microscópio, localizada na extremidade de um *cantilever* flexível, é mantida em contato com a superfície da amostra. As variações na deflexão do *cantilever* durante a varredura são monitoradas, mantendo o contato constante por meio de um circuito eletrônico de *feedback*. As imagens topográficas

são geradas a partir do mapeamento da distância vertical do *cantilever* em cada ponto da varredura. A força aplicada pela ponta é mantida constante e em valores abaixo de 100 pN, permitindo a análise de amostras biológicas em líquido (ALONSO; GOLDMANN, 2003). O modo de contato (Figura 4b) apresenta a vantagem de avaliar muito bem a topografia de uma superfície, mesmo na presença de grandes variações de altura, e pode ser empregado tanto em ar quanto em líquido. A desvantagem, entretanto, se deve à elevada força lateral resultante que, em alguns casos, pode causar danos ao material avaliado e à ponta utilizada (ALONSO; GOLDMANN, 2003; GADEGAARD, 2006).

O modo de contato intermitente (*tapping mode*) (Figura 4a) evita os inconvenientes descritos acima, uma vez que há contato intermitente da ponta com a amostra (HANSMA et al., 1994; PUTMAN et al., 1994). Neste modo de varredura, conforme a ponta oscila para cima e para baixo, informações adicionais podem ser obtidas. Tais informações resultam tanto das propriedades mecânicas da superfície, quanto das interações entre a ponta e a amostra, sendo estas últimas bastante utilizadas na elaboração de mapeamentos químicos (FINOT; MCDERMOTT, 1997).

O modo de contraste de fase é relativamente novo, e apresenta a vantagem de poder ser realizado simultaneamente ao modo de contato intermitente. Ou seja, imagens topográficas e de contraste de fase podem ser obtidas em uma única varredura. Uma vez que as interações entre a ponta e a superfície da amostra não dependem somente de sua topografia, mas também de outras características (rigidez, elasticidade, adesão ou fricção), os movimentos do *cantilever* também são influenciados por estes fatores. O modo de contraste de fase pode detectar a presença de diferentes componentes, além de características físicas e químicas da amostra (ALONSO; GOLDMANN, 2003).

O modo de força lateral promove um movimento de torção do *cantilever*, que pode ser registrado por meio do movimento horizontal do feixe de laser no detector (GRAFSTRÖM et al., 1994). Este modo é também conhecido como microscopia de força química (ASHBY; CHEN; LIEBER, 2000).

No modo força-distância, o *cantilever* se comporta como uma pequena mola, possibilitando mensurar as forças existentes entre a ponta e a amostra. Neste caso, a força aplicada (F) é proporcional à deflexão (d) do *cantilever*, conforme a lei de Hooke (GADEGAARD, 2006):

$$F = k \times d$$

A constante de proporcionalidade (k), denominada constante de mola, pode ser determinada experimentalmente, ou fornecida pelo fabricante do *cantilever*. Conforme a ponta se aproxima da superfície, forças de interação surgem entre ambas. A uma distância de aproximadamente 50 nm da superfície, forças eletrostáticas passam a interagir com a ponta, promovendo a deflexão do *cantilever*. Entretanto, somente a poucos nanômetros de distância, forças atrativas atuam de forma a estabelecer o contato da ponta com a amostra (GADEGAARD, 2006).

Fonte: SANTOS; CASTANHO, 2004.

Figura 4 – Representação esquemática dos modos de varredura de contato intermitente (a) e de contato (b)

A utilização da AFM para fins de nanoindentação tem se tornado uma ferramenta bastante útil na caracterização das propriedades elásticas de amostras biológicas (RADMACHER et al., 1996; BUSHELL et al., 1999; YAMANE et al., 2000; SIMON et al., 2003; DULINSKA et al., 2006; ROSENBLUTH; LAM; FLETCHER, 2006; ZIEBARTH et al., 2007; LAST et al., 2009). Neste tipo de operação, o *cantilever* atua como um nanoindentador e, devido à reduzida dimensão da ponta, permite a avaliação local de amostras pequenas, delgadas e heterogêneas, como células ou tecidos (ALONSO; GOLDMANN, 2003; EBENSTEIN; PRUITT, 2006).

A nanoindentação envolve a aplicação de uma força controlada à superfície da amostra, produzindo uma deformação local. A força aplicada e a deformação resultante são monitoradas durante o processo de indentação e afastamento da ponta, e determinadas propriedades mecânicas são calculadas a partir das curvas obtidas (Figura 5) (EBENSTEIN; PRUITT, 2006). Plaquetas (RADMACHER et al., 1996), fibroblastos (BUSHELL et al., 1999), astrócitos (YAMANE et al., 2000), osteoblastos (SIMON et al., 2003), eritrócitos (DULINSKA et al., 2006), neutrófilos (ROSENBLUTH; LAM; FLETCHER, 2006), cartilagem (WEISENHORN et al., 1993), cristalino (ZIEBARTH et al., 2007) e membranas basais da córnea (LAST et al., 2009) são alguns exemplos de células e tecidos cujas propriedades biomecânicas foram determinadas por meio da AFM. Parte destes estudos, inclusive, avaliou as características elásticas de células e/ou tecidos em diferentes condições, de acordo com a forma de preparo da amostra (YAMANE et al., 2000) ou certas condições patológicas (DULINSKA et al., 2006; ROSENBLUTH; LAM; FLETCHER, 2006).

A escolha da ponta a ser utilizada nos procedimentos de nanoindentação é um fator importante a ser considerado, uma vez que cada tipo de formato atua de forma diferente no processo. Para amostras mais rígidas, como metais, cerâmicas e tecidos mineralizados, pontas de extremidade fina são comumente utilizadas. Entretanto, na avaliação de tecidos macios e polímeros, indica-se a utilização de pontas esféricas, a fim de minimizar a ocorrência de deformação plástica e evitar danos à amostra (EBENSTEIN; PRUITT, 2006).

A dimensão da ponta utilizada também deve ser levada em conta na avaliação de tecidos macios. Pontas esféricas de diâmetro maior ($> 50 \mu\text{m}$) são as mais indicadas na mensuração das propriedades mecânicas de um tecido, pois a área de contato entre estas e a amostra se torna muito maior do que células ($\sim 8 \mu\text{m}$) ou fibras isoladas (EBENSTEIN; PRUITT, 2004).

Fonte: Adaptado de VINCKIER; SEMENZA, 1998.

Figura 5 – Representação esquemática de curvas força-distância em uma amostra rígida (b) e em uma amostra macia (c). A ilustração (a) mostra uma situação onde não há contato estabelecido entre a ponta e a amostra. Na ilustração (b), o contato da ponta a uma superfície rígida promove a deflexão do *cantilever*. A ilustração (c) mostra a deformação de uma amostra macia, resultante do contato com a ponta, fazendo com que haja um desvio da relação linear entre a força e a distância. A diferença entre as duas curvas se refere à medida da indentação

2.3.2.3 Preparo da amostra

Uma das grandes vantagens da AFM é a sua capacidade de operar em praticamente qualquer ambiente. Para se analisar amostras biológicas em um microscópio eletrônico, estas precisam ser submetidas a um meticuloso preparo, que envolve a fixação, desidratação e cobertura com material condutor. Cada uma destas etapas pode produzir artefatos indesejáveis, como a retração e/ou demais alterações morfológicas das células. Uma vez que o microscópio de força atômica opera tanto em ar quanto em líquido, as células podem ser analisadas em seu estado natural, sem a necessidade de qualquer processamento (GADEGAARD, 2006).

A AFM pode analisar uma ampla gama de materiais, e sua única limitação se refere às dimensões físicas da amostra. Conforme mencionado anteriormente, somente variações de altura entre 1 – 20 μm podem ser avaliadas pelo microscópio

de força atômica. Portanto, superfícies irregulares não são consideradas substratos úteis para a AFM. Mica, vidro, silício e grafite são os substratos mais comumente utilizados (GADEGAARD, 2006).

Quanto às condições ambientais, a estabilidade mecânica é considerada o requisito principal. Uma vez que o microscópio atua de forma mecânica, exercendo forças sobre a amostra, esta deve permanecer estável e não se movimentar durante a varredura (GADEGAARD, 2006).

A maior vantagem da AFM é a sua capacidade de registrar imagens e dados em ambientes líquidos. Duas técnicas clássicas podem ser empregadas nestas situações. A forma mais simples é a instilação de uma gota da solução desejada sobre a amostra. Entretanto, pode ocorrer a evaporação desta, devido ao seu reduzido volume (20 – 200 μ l). Como alternativa, diversos fabricantes oferecem células líquidas específicas, reduzindo desta forma a evaporação da solução (GADEGAARD, 2006).

A possibilidade de realizar mensurações em meio líquido é de extrema importância no estudo de amostras biológicas. A operação em líquidos elimina as forças de adesão existentes entre a ponta e a amostra, uma vez que ambas se encontram cobertas pela solução. Portanto, confere acurácia ao procedimento, pois há um maior controle da força aplicada (DRAKE et al., 1989).

2.3.2.4 Análise das imagens e dos dados

A maior parte dos microscópios fornece *softwares* específicos, com ferramentas capazes de corrigir e filtrar os dados, além de vários modos de exibir as imagens obtidas (GADEGAARD, 2006). Entretanto, em se tratando de mensurações de elasticidade, alguns cálculos adicionais devem ser realizados, com base nas curvas força-distância obtidas (VINCKIER; SEMENZA, 1998).

A curva força-distância relaciona os valores de força aplicada à distância resultante entre a ponta e a superfície da amostra, sendo considerada a base para o cálculo do módulo de elasticidade (módulo de Young) do material analisado. Até o presente momento, o modelo de Hertz tem sido utilizado pela maioria dos autores na estimativa do módulo de Young de células e tecidos (KUZNETSOVA et al., 2007).

O modelo de Hertz basicamente descreve a deformação elástica de dois corpos homogêneos e regulares, mantidos em contato por meio de uma força aplicada. Dois aspectos importantes do modelo de Hertz devem ser considerados: a estrutura indentadora deve apresentar formato parabólico e a amostra a ser indentada deve ser mais espessa que a profundidade de indentação (KUZNETSOVA et al., 2007). Entretanto, algumas variações do modelo de Hertz foram desenvolvidas para diferentes formas geométricas das pontas (LIN; DIMITRIADIS; HORKAY, 2007).

Se a ponta do microscópio apresenta forma aproximadamente esférica, com seu raio R , então a força no cantilever F é dada pela equação:

$$F = \frac{4}{3} \frac{E \sqrt{R} h^{3/2}}{1 - \nu^2}$$

onde h se refere à profundidade da indentação, ν corresponde ao coeficiente de Poisson (aproximadamente 0,5 para amostras biológicas) e E equivale ao módulo de elasticidade do sistema ponta-amostra (VINCKIER; SEMENZA, 1998; LAST et al., 2009).

Os valores obtidos da curva força-distância são z , z_0 , d e d_0 , onde z se refere ao deslocamento piezoelétrico e d corresponde à deflexão do cantilever. Os valores z_0 e d_0 , por sua vez, correspondem ao contato inicial da ponta com a amostra. Estes dados são utilizados no cálculo da profundidade de indentação (h), dado pela equação (LAST et al., 2009):

$$h = (z - z_0) - (d - d_0)$$

Sabendo-se que $F = k(d - d_0)$, onde k se refere à constante de mola do cantilever, pode-se obter o valor de E (módulo de Young) para cada ponto da curva força-distância pela equação (LAST et al., 2009):

$$E = \frac{3}{4} \frac{k(d - d_0)(1 - \nu^2)}{\sqrt{R} ((z - z_0) - (d - d_0))^{3/2}}$$

Algumas variações foram desenvolvidas para cada forma geométrica da ponta. No caso da utilização de pontas piramidais, o cálculo inclui o ângulo da face

da ponta (α), substituindo o raio, conforme a seguinte equação (LIN; DIMITRIADIS; HORKAY, 2007):

$$F = \frac{E}{1 - \nu^2} \frac{\tan \alpha}{\sqrt{2}} h^2$$

2.3.3 Uso da AFM na avaliação da córnea

Alguns estudos, voltados à pesquisa da ultraestrutura corneana e escleral foram publicados, nos quais são avaliados não somente a organização das fibras colágenas e suas interações com os proteoglicanos, como também o conteúdo dos espaços interfibrilares (MELLER; PETERS; MELLER, 1997; YAMAMOTO et al., 1997; MIYAGAWA et al., 2001; YAMAMOTO et al., 2002).

Outros experimentos, inclusive, foram capazes de produzir imagens de alta-resolução da superfície endotelial posterior na córnea de coelhos (LYDATAKI et al., 2003). A avaliação da superfície epitelial corneana também foi possibilitada por meio da AFM, fornecendo imagens de ótima resolução e magnificação (TSILIMBARIS et al., 2000).

Estudo recente avaliou as propriedades biomecânicas das membranas basais da córnea por meio da AFM. Córneas humanas foram submetidas à imersão em solução de EDTA, com a finalidade de remover as células epiteliais e endoteliais. Utilizando dois tipos de pontas esféricas (raios de 1 μm e 5 μm), foram realizadas indentações sobre a membrana basal anterior e a membrana de Descemet, em célula líquida contendo PBS. Os dados foram então analisados com base no modelo de Hertz. Os valores dos módulos de elasticidade (módulo de Young) obtidos na membrana basal anterior variaram entre 2 – 15 kPa, com média de $7,5 \pm 4,2$ kPa. Os valores dos módulos de elasticidade da membrana de Descemet variaram entre 30 – 60 kPa, com média de $50 \pm 17,8$ kPa (LAST et al., 2009).

3 OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo avaliar as propriedades biomecânicas de diferentes regiões da córnea suína por meio da microscopia da força atômica.

4 MATERIAL E MÉTODO

O preparo das amostras foi realizado no Laboratório Experimental de Oftalmologia Comparada, pertencente ao Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A análise das amostras foi conduzida junto ao Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Instituto de Química da Universidade São Paulo. O projeto foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, conforme o protocolo nº 1968/2010.

4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS

Dezesseis bulbos oculares não escaldados, de oito animais da espécie suína, foram adquiridos em frigorífico local. Animais de diferentes raças, faixas de peso e idade foram utilizados neste estudo. Os olhos foram identificados separadamente, como direito ou esquerdo, sendo submetidos ao preparo em até 2 horas após o abate, e aproximadamente 24 horas antes da avaliação por meio da microscopia de força atômica.

Inicialmente, os bulbos oculares foram imersos em solução salina estéril (NaCl 0.9%), a fim de remover os resíduos sanguíneos e demais sujidades (Figura 6). O excesso de tecido extraocular foi removido com o auxílio de uma tesoura cirúrgica.

Fonte: Laboratório Experimental de Oftalmologia Comparada

Figura 6 – Representação fotográfica da higienização de bulbo ocular suíno em solução salina estéril (NaCl 0,9%)

Após a higienização dos mesmos, realizou-se a mensuração da espessura corneal (paquimetria inicial), utilizando um paquímetro ultrassônico (PachPen®, Accutome, EUA). As medidas foram realizadas em regiões central, superior, inferior, nasal e temporal, em ambos os olhos (Figuras 7, 8 e 9).

Figura 7 – Representação esquemática das regiões da córnea analisadas. As regiões central (C), superior (S), inferior (I), nasal (N) e temporal (T) foram avaliadas em bulbos oculares direito (A) e esquerdo (B)

Fonte: Laboratório Experimental de Oftalmologia Comparada

Figura 8 – Representação fotográfica da mensuração da espessura corneal utilizando paquímetro ultrassônico (PachPen®, Accutome, EUA)

Fonte: Laboratório Experimental de Oftalmologia Comparada

Figura 9 – Representação fotográfica, em detalhe, do procedimento de paquimetria ultrassônica

Uma vez registrados os valores obtidos, realizou-se o debridamento da camada epitelial da córnea, com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 11 (Figura 11). Uma nova mensuração da paquimetria foi realizada em cada região após este procedimento (paquimetria pós-debridamento).

Fonte: Laboratório Experimental de Oftalmologia Comparada

Figura 10 – Representação fotográfica do processo de debridamento da camada epitelial da córnea

Os bulbos oculares foram então armazenados em solução de dextran a 25%, preparada a partir da diluição de dextran de peso molecular 70000 da (Sigma-Aldrich, EUA) em solução tampão fosfato (PBS) de pH 7,4, com base em estudos prévios (TERRY; OUSLEY; ZJHRA, 1994; HJORTDAL, 1995,1996; HAMAOUUI et al., 2001; BORJA et al., 2004). Cada bulbo ocular – direito e esquerdo – foi armazenado em um frasco individual devidamente identificado, contendo 1,5 ml da solução. Os olhos permaneceram submersos nesta solução durante 24 horas, em temperatura ambiente.

Transcorridas 24 horas de armazenamento, uma nova mensuração da paquimetria foi realizada em cada região da córnea (paquimetria pós-dextran). Utilizando fio de seda 8-0, posicionou-se um ponto simples separado na região do limbo adjacente ao limite superior da córnea, com o intuito de guiar o preparo dos fragmentos (Figura 12). Fragmentos de córnea com dimensão aproximada de 3x3 mm, correspondentes às regiões acima citadas, foram obtidos com o auxílio de lâminas de bisturi nº 11. Estes foram posteriormente armazenados em microtubos de centrifugação identificados, preenchidos com 0,5 ml de solução dextran a 25%.

Fonte: Laboratório Experimental de Oftalmologia Comparada

Figura 11 – Representação fotográfica de bulbo ocular esquerdo, destacando a presença de ponto simples separado em região de limbo, adjacente ao limite superior da córnea

Após 60 minutos submersos na solução, os fragmentos eram submetidos à mensuração de sua espessura, utilizando um micrômetro de precisão externo digital (Figuras 13 e 14) com resolução de 0,001 mm (Digimess®, Brasil). O excesso de umidade de cada fragmento foi removido utilizando papel filtro.

Fonte: Laboratório Experimental de Oftalmologia Comparada

Figura 12 – Representação fotográfica de fragmento de córnea posicionado sobre a superfície do micrômetro de precisão (Digimess®, Brasil)

Fonte: Laboratório Experimental de Oftalmologia Comparada

Figura 13 – Representação fotográfica da mensuração de espessura do fragmento utilizando micrômetro de precisão (Digimess®, Brasil)

As amostras foram aderidas a lamínulas de vidro de 20x20 mm, por meio da utilização de adesivo cirúrgico (Vetbond®, 3M, EUA), conforme descrito em estudo anterior (LAST et al., 2009). Todas as amostras foram aderidas com a superfície estromal voltada para cima, e cada lamínula foi preparada imediatamente antes da análise da amostra pelo microscópio de força atômica (Figura 15).

Fonte: Laboratório Experimental de Oftalmologia Comparada

Figura 14 – Representação fotográfica de fragmento de córnea aderido à lamínula de vidro, por meio da utilização de adesivo cirúrgico (Vetbond®, 3M, EUA)

4.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

As mensurações de elasticidade foram conduzidas no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Instituto de Química da Universidade São Paulo, utilizando microscópio de força atômica PicoSPM-1 (Molecular Imaging/Agilent, EUA) (Figuras 16 e 17). As amostras foram avaliadas por meio do modo contato, em célula líquida contendo solução de dextran a 25%. Todos os *cantilevers* utilizados apresentavam forma trapezoidal, porém as constantes de força variaram entre as amostras, uma vez que estes eram substituídos sempre que necessário. Tanto os *cantilevers* quanto as pontas eram feitos de silício. Os *cantilevers* apresentavam constante de mola entre 2,8 e 5,6 N/m. As pontas empregadas em todas as amostras apresentavam forma geométrica piramidal, comprimento variando entre 10 e 15 μm , e raio equivalente a 5 nm (Figuras 18, 19 e 20).

Fonte: Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia

Figura 15 – Representação fotográfica do microscópio de força atômica PicoSPM-1 (Molecular Imaging/Agilent, EUA)

Fonte: Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia

Figura 16 – Representação fotográfica dos sistemas controladores PicoScan 2100 (Molecular Imaging/Agilent, EUA) e MAC Mode Controller (Molecular Imaging/Agilent, EUA), associado a um computador pessoal contendo software específico do equipamento

Fonte: Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia

Figura 17 – Representação fotográfica de recipiente contendo os *chips* utilizados na análise das amostras. Destaque – *chip* suporte contendo *cantilever* e ponta

Fonte: Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia

Figura 18 – Representação fotográfica, em detalhe, do *chip* suporte contendo *cantilever* e ponta. Destaque – localização do *cantilever* e da ponta

Fonte: Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia

Figura 19 – Representação fotográfica do *chip* suporte (destaque), acoplado ao sistema de varredura do microscópio

Para cada *cantilever* utilizado, era necessário mensurar os valores de referência, empregando o vidro como substrato. Nesta etapa, uma lamínula de vidro de 20x20 mm era adaptada à célula líquida do microscópio, preenchida com solução de dextran a 25%. Foram obtidos sete valores de referência por *cantilever* utilizado.

Após o registro dos valores de referências, a lamínula contendo a amostra era então adaptada à célula líquida, também preenchida com solução de dextran a 25%, para a mensuração da elasticidade do fragmento em nove diferentes pontos (Figuras 21 e 22). Todas as amostras foram submetidas à análise em até 24 horas após o preparo.

Fonte: Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia

Figura 20 – Representação fotográfica de célula líquida (destaque) preenchida com solução de dextran a 25%, contendo lamínula com amostra aderida

Fonte: Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia

Figura 21 – Representação fotográfica, em detalhe, de célula líquida preenchida com solução de dextran a 25%, contendo lamínula com amostra aderida (destaque)

As nove curvas obtidas para cada fragmento foram posteriormente analisadas utilizando o modelo de Hertz, com o auxílio do software OriginPro8 (OriginLab, EUA), a fim de calcular o módulo de elasticidade (módulo de Young) em cada ponto.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação das diversas variáveis (paquimetria inicial, paquimetria pós-debridamento, paquimetria pós-dextran, micrometria e módulo de elasticidade) entre as diferentes regiões (central, superior, inferior, nasal e temporal), o teste utilizado foi a Análise de Variância (ANOVA). Para a utilização deste teste foi verificado se, para cada variável, as variâncias eram homogêneas entre os grupos. Para as comparações foi considerado um nível de significância de 5%.

A fim de comparar os resultados médios entre os parâmetros paquimetria inicial, paquimetria pós-debridamento, paquimetria pós-dextran e micrometria, foi empregada a Análise de Variância (ANOVA) com Medidas Repetidas. Para identificar quais variáveis se diferenciavam entre si foram realizadas as comparações entre duas a duas variáveis através do teste de Bonferroni.

Para as comparações entre os dois lados (direito e esquerdo), o teste utilizado foi o teste não paramétrico de Wilcoxon. Trata-se deste teste com amostras emparelhadas, pois valores obtidos para os lados direito e esquerdo são referentes a um mesmo animal. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%, seja, foi considerado haver diferença entre os lados quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram divididos conforme a variável analisada.

5.1 COMPARAÇÃO ENTRE AS REGIÕES DA CÓRNEA

5.1.1 Paquimetria inicial

Pelos resultados a seguir (Tabela 1 e Gráfico 1), pôde-se observar que não houve diferença entre as regiões com relação à paquimetria inicial, $p = 0,573$ ($p > 0,05$).

Tabela 1 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria inicial, para cada região da córnea - São Paulo - 2010

Paquimetria inicial (μm)					
	central	superior	inferior	nasal	temporal
média	798,8	791,9	797,1	749,8	762,4
mediana	795,8	793,8	794,8	748,3	747,3
desvio padrão	81,9	65,8	75,3	76,0	68,6
mínimo	691,5	705,5	699,0	668,0	697,0
máximo	946,5	897,0	933,5	906,5	912,5

Gráfico 1 – Representação gráfica das médias de paquimetria inicial em cada região da córnea avaliada

5.1.2 Paquimetria pós-debridamento

Pelos resultados a seguir (Tabela 2 e Gráfico 2), pôde-se observar que não houve diferença entre as regiões com relação à paquimetria pós-debridamento, $p = 0,543$ ($p > 0,05$).

Tabela 2 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-debridamento, para cada região da córnea - São Paulo - 2010

Paquimetria pós-debridamento (μm)					
	central	superior	inferior	nasal	temporal
média	726,1	735,1	743,4	693,2	698,6
mediana	731,0	735,3	741,8	688,8	691,3
desvio padrão	78,1	57,8	74,4	72,9	70,5
mínimo	624,5	661,5	654,0	601,0	623,0
máximo	875,0	844,5	891,0	847,5	855,5

Gráfico 2 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-debridamento em cada região da córnea avaliada

5.1.3 Paquimetria pós-dextran

Pelos resultados a seguir (Tabela 3 e Gráfico 3), pôde-se observar que não houve diferença entre as regiões com relação à paquimetria pós-dextran, $p = 0,722$ ($p > 0,05$).

Tabela 3 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-dextran, para cada região da córnea - São Paulo - 2010

Paquimetria pós-dextran (μm)					
	central	superior	inferior	nasal	temporal
Média	796,6	781,6	826,5	769,6	767,3
Mediana	761,3	795,5	795,0	771,3	767,8
desvio padrão	87,6	101,3	99,4	100,9	86,8
Mínimo	705,5	617,0	684,5	615,5	636,0
Máximo	951,0	910,5	960,5	897,5	888,0

Gráfico 3 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-dextran em cada região da córnea avaliada

5.1.4 Micrometria

Pelos resultados a seguir (Tabela 4 e Gráfico 4), pôde-se observar que não houve diferença entre as regiões com relação à micrometria, $p = 0,947$ ($p > 0,05$).

Tabela 4 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da micrometria, para cada região da córnea - São Paulo - 2010

Micrometria (μm)					
	central	superior	Inferior	nasal	temporal
média	716,5	758,3	729,3	727,9	711,2
mediana	674,0	744,8	701,5	682,0	685,5
desvio padrão	114,5	109,5	127,5	126,7	128,7
Mínimo	613,0	627,0	541,5	585,0	579,5
Máximo	922,5	910,0	930,5	930,5	919,5

Gráfico 4 – Representação gráfica das médias de micrometria em cada região da córnea avaliada

5.1.5 Módulo de elasticidade

Pelos resultados a seguir (Tabela 5 e Gráfico 5), pôde-se observar que não houve diferença entre as regiões com relação ao módulo de elasticidade, $p = 0,654$ ($p > 0,05$).

Tabela 5 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo do módulo de elasticidade, para cada região da córnea - São Paulo - 2010

Módulo de elasticidade (kPa)					
	central	superior	inferior	nasal	temporal
Média	0,73	0,63	1,14	1,30	0,64
Mediana	0,44	0,52	0,52	0,56	0,56
desvio padrão	0,69	0,49	1,26	1,96	0,36
Mínimo	0,28	0,21	0,23	0,22	0,23
Máximo	2,33	1,77	3,65	6,04	1,27

Gráfico 5 – Representação gráfica das médias do módulo de elasticidade em cada região da córnea avaliada

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIDAS DE PAQUIMETRIA

Pelos resultados abaixo (Tabela 6 e Gráfico 6), pôde-se observar que houve diferença entre as variáveis paquimetria inicial, paquimetria pós-debridamento, paquimetria pós-dextran e micrometria, $p < 0,001$ ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo das medidas de paquimetria (paquimetria inicial, paquimetria pós-debridamento, paquimetria pós-dextran e micrometria) - São Paulo - 2010

	Paquimetria inicial (μm)	Paquimetria pós-debr. (μm)	Paquimetria pós-dextran (μm)	Micrometria (μm)
Média	780,0	719,3	788,3	728,6
Mediana	777,5	712,5	776,0	691,5
Desvio padrão	72,8	70,3	93,1	116,4
Mínimo	668,0	601,0	615,5	541,5
Máximo	946,5	891,0	960,5	930,5

Gráfico 6 - Representação gráfica das médias de cada medida de paquimetria

A paquimetria inicial se diferenciou das demais medidas, exceto da paquimetria pós-dextran, evidenciando que, em média, o valor da paquimetria inicial é maior do que as outras duas medidas (Tabela 7).

A paquimetria pós-debridamento se diferenciou das demais medidas, exceto da micrometria, evidenciando que, em média, o valor da paquimetria pós-debridamento é menor do que as outras duas medidas (Tabela 7).

Tabela 7 – Comparações múltiplas entre as medidas de paquimetria - São Paulo - 2010

Comparações de interesse			p-valor
Paquimetria Inicial (μm)	x	Paquimetria Pós-debridamento (μm)	<0,001
Paquimetria Inicial (μm)	x	Paquimetria Pós-dextran (μm)	>0,999
Paquimetria Inicial (μm)	x	Micrometria fragmentos (μm)	0,010
Paquimetria Pós-debridamento (μm)	x	Paquimetria Pós-dextran (μm)	<0,001
Paquimetria Pós-debridamento (μm)	x	Micrometria fragmentos (μm)	>0,999
Paquimetria Pós-dextran (μm)	x	Micrometria fragmentos (μm)	0,002

5.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS OLHOS DIREITOS E ESQUERDOS

5.3.1 Região central

Em relação à paquimetria inicial na região central da córnea (Tabela 8 e Gráfico 7), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,123$ ($p > 0,05$).

Tabela 8 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria inicial, realizada na região central da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Paquimetria inicial (μm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	792,8	791,0	80,2	689,0	924,0
E	804,9	800,5	85,4	693,0	969,0

Gráfico 7 – Representação gráfica das médias de paquimetria inicial, realizada em região central da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação à paquimetria pós-debridamento na região central da córnea (Tabela 9 e Gráfico 8), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,161$ ($p > 0,05$).

Tabela 9 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-debridamento, realizada na região central da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Paquimetria pós-debridamento (μm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	721,4	721,0	76,3	623,0	859,0
E	730,8	724,0	81,6	626,0	891,0

Gráfico 8 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-debridamento, realizada em região central da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação à paquimetria pós-dextran na região central da córnea (Tabela 10 e Gráfico 9), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significante, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,499$ ($p > 0,05$).

Tabela 10 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-dextran, realizada na região central da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Paquimetria pós-dextran (µm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	791,6	778,5	82,5	687,0	925,0
E	801,6	772,5	98,8	696,0	977,0

Gráfico 9 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-dextran, realizada em região central da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação à micrometria na região central da córnea (Tabela 11 e Gráfico 10), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,833$ ($p > 0,05$).

Tabela 11 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da micrometria, realizada em fragmento central da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Micrometria (μm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	716,4	684,0	139,9	555,0	957,0
E	716,6	706,0	104,4	585,0	888,0

Gráfico 10 – Representação gráfica das médias da micrometria, realizada em fragmento central da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação ao módulo de elasticidade na região central da córnea (Tabela 12 e Gráfico 11), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,263$ ($p > 0,05$).

Tabela 12 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo do módulo de elasticidade, na região central da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Módulo de elasticidade (kPa)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	0,59	0,50	0,39	0,21	1,43
E	0,86	0,45	1,00	0,23	3,23

Gráfico 11 – Representação gráfica das médias do módulo de elasticidade da região central da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

5.3.2 Região superior

Em relação à paquimetria inicial na região superior da córnea (Tabela 13 e Gráfico 12), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,386$ ($p > 0,05$).

Tabela 13 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria inicial, realizada na região superior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Paquimetria inicial (μm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	787,3	777,5	73,3	678,0	899,0
E	796,6	786,5	63,3	698,0	895,0

Gráfico 12 – Representação gráfica das médias de paquimetria inicial, realizada em região superior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação à paquimetria pós-debridamento na região superior da córnea (Tabela 14 e Gráfico 13), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,102$ ($p > 0,05$).

Tabela 14 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-debridamento, realizada na região superior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Paquimetria pós-debridamento (μm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	722,4	723,0	67,3	640,0	852,0
E	747,8	755,0	51,5	682,0	837,0

Gráfico 13 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-debridamento, realizada em região superior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação à paquimetria pós-dextran na região superior da córnea (Tabela 15 e Gráfico 14), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,753$ ($p > 0,05$).

Tabela 15 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-dextran, realizada na região superior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Paquimetria pós-dextran (µm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	784,0	814,5	115,9	606,0	910,0
E	779,1	793,0	103,4	628,0	911,0

Gráfico 14 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-dextran, realizada em região superior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação à micrometria na região superior da córnea (Tabela 16 e Gráfico 15), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significante, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,074$ ($p > 0,05$).

Tabela 16 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da micrometria, realizada em fragmento superior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Micrometria (μm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	748,4	705,0	115,0	624,0	899,0
E	768,3	766,5	114,1	628,0	934,0

Gráfico 15 – Representação gráfica das médias da micrometria, realizada em fragmento superior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação ao módulo de elasticidade na região superior da córnea (Tabela 17 e Gráfico 16), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,412$ ($p > 0,05$).

Tabela 17 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo do módulo de elasticidade, na região superior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Módulo de elasticidade (kPa)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	0,51	0,33	0,39	0,21	1,38
E	0,75	0,61	0,63	0,21	2,16

Gráfico 16 – Representação gráfica das médias do módulo de elasticidade da região superior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

5.3.3 Região inferior

Em relação à paquimetria inicial na região inferior da córnea (Tabela 18 e Gráfico 17), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,386$ ($p > 0,05$).

Tabela 18 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria inicial, realizada na região inferior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

	Paquimetria inicial (μm)				
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	798,13	793,0	84,9	688,0	935,0
E	796	792,0	70,0	695,0	932,0

Gráfico 17 – Representação gráfica das médias de paquimetria inicial, realizada em região inferior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação à paquimetria pós-debridamento na região inferior da córnea (Tabela 19 e Gráfico 18), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,102$ ($p > 0,05$).

Tabela 19 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-debridamento, realizada na região inferior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Paquimetria pós-debridamento (µm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	747,25	745,0	83,9	643,0	908,0
E	739,5	735,0	68,9	649,0	874,0

Gráfico 18 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-debridamento, realizada em região inferior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação à paquimetria pós-dextran na região inferior da córnea (Tabela 20 e Gráfico 19), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,753$ ($p > 0,05$).

Tabela 20 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-dextran, realizada na região inferior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Paquimetria pós-dextran (μm)					
	média	mediana	desvio padrão	mínimo	máximo
D	819	804,0	101,2	702,0	978,0
E	834	820,5	107,2	667,0	986,0

Gráfico 19 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-dextran, realizada em região inferior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação à micrometria na região inferior da córnea (Tabela 21 e Gráfico 20), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,074$ ($p > 0,05$).

Tabela 21 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da micrometria, realizada em fragmento inferior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Micrometria (µm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	719,5	701,5	124,1	567,0	914,0
E	739	704,5	139,1	503,0	947,0

Gráfico 20 – Representação gráfica das médias da micrometria, realizada em fragmento inferior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação ao módulo de elasticidade na região inferior da córnea (Tabela 22 e Gráfico 21), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,412$ ($p > 0,05$).

Tabela 22 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo do módulo de elasticidade, na região inferior da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Módulo de elasticidade (kPa)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	0,77	0,51	0,82	0,19	2,56
E	1,50	0,55	2,27	0,24	6,80

Gráfico 21 – Representação gráfica das médias do módulo de elasticidade da região inferior da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

5.3.4 Região nasal

Em relação à paquimetria inicial na região nasal da córnea (Tabela 23 e Gráfico 22), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,386$ ($p > 0,05$).

Tabela 23 - Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria inicial, realizada na região nasal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Paquimetria inicial (μm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	747,88	736,5	86,1	660,0	927,0
E	751,75	732,5	72,2	669,0	886,0

Gráfico 22 – Representação gráfica das médias de paquimetria inicial, realizada em região nasal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação à paquimetria pós-debridamento na região nasal da córnea (Tabela 24 e Gráfico 23), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,102$ ($p > 0,05$).

Tabela 24 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-debridamento, realizada na região nasal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Paquimetria pós-debridamento (μm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	688	676,5	82,1	600,0	873,0
E	698,38	695,0	71,8	602,0	822,0

Gráfico 23 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-debridamento, realizada em região nasal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação à paquimetria pós-dextran na região nasal da córnea (Tabela 25 e Gráfico 24), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,753$ ($p > 0,05$).

Tabela 25 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-dextran, realizada na região nasal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Paquimetria pós-dextran (μm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	779,88	784,5	97,9	634,0	892,0
E	759,38	758,0	114,1	597,0	903,0

Gráfico 24 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-dextran, realizada em região nasal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação à micrometria na região nasal da córnea (Tabela 26 e Gráfico 25), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,074$ ($p > 0,05$).

Tabela 26 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da micrometria, realizada em fragmento nasal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Micrometria (μm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	705,63	649,5	120,4	578,0	906,0
E	750,13	732,0	137,9	556,0	955,0

Gráfico 25 – Representação gráfica das médias da micrometria, realizada em fragmento nasal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação ao módulo de elasticidade na região nasal da córnea (Tabela 27 e Gráfico 26), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,412$ ($p > 0,05$).

Tabela 27 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo do módulo de elasticidade, na região nasal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Módulo de elasticidade (kPa)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	1,96	0,66	3,54	0,20	10,60
E	0,64	0,52	0,41	0,24	1,47

Gráfico 26 – Representação gráfica das médias do módulo de elasticidade da região nasal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

5.3.5 Região temporal

Em relação à paquimetria inicial na região temporal da córnea (Tabela 28 e Gráfico 27), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,779$ ($p > 0,05$).

Tabela 28 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria inicial, realizada na região temporal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Paquimetria inicial (μm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	763,5	754,0	70,7	679,0	921,0
E	761,38	736,5	70,8	674,0	904,0

Gráfico 27 – Representação gráfica das médias de paquimetria inicial, realizada em região temporal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação à paquimetria pós-debridamento na região temporal da córnea (Tabela 29 e Gráfico 28), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,327$ ($p > 0,05$).

Tabela 29 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-debridamento, realizada na região temporal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Paquimetria pós-debridamento (µm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	693,38	675,0	67,8	637,0	853,0
E	703,88	701,0	76,9	598,0	858,0

Gráfico 28 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-debridamento, realizada em região temporal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação à paquimetria pós-dextran na região temporal da córnea (Tabela 30 e Gráfico 29), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,575$ ($p > 0,05$).

Tabela 30 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da paquimetria pós-dextran, realizada na região temporal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Paquimetria pós-dextran (μm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	752,5	778,0	108,3	570,0	876,0
E	782,13	779,5	93,8	659,0	908,0

Gráfico 29 – Representação gráfica das médias de paquimetria pós-dextran, realizada em região temporal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação à micrometria na região temporal da córnea (Tabela 31 e Gráfico 30), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,327$ ($p > 0,05$).

Tabela 31 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo da micrometria, realizada em fragmento temporal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Micrometria (μm)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	700,25	665,5	127,8	534,0	896,0
E	722,13	689,0	140,8	512,0	943,0

Gráfico 30 – Representação gráfica das médias da micrometria, realizada em fragmento temporal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

Em relação ao módulo de elasticidade na região temporal da córnea (Tabela 32 e Gráfico 31), pôde-se observar que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os olhos direitos e esquerdos, $p = 0,889$ ($p > 0,05$).

Tabela 32 – Valores de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo do módulo de elasticidade, na região temporal da córnea, em olhos direitos e esquerdos - São Paulo - 2010

Módulo de elasticidade (kPa)					
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
D	0,64	0,59	0,35	0,21	1,23
E	0,64	0,51	0,48	0,21	1,49

Gráfico 31 - Representação gráfica das médias do módulo de elasticidade da região temporal da córnea, em olhos direitos (D) e esquerdos (E)

6 DISCUSSÃO

A avaliação das propriedades elásticas da córnea tem ocupado espaço importante na literatura científica oftalmológica, uma vez que diversos procedimentos e oftalmopatias estão relacionados a estas características.

O estroma corneal, devido à específica orientação de suas lamelas, é a camada que exerce maior influência sobre as propriedades mecânicas da córnea (HJORTDAL, 1996). Estudos realizados utilizando a microscopia eletrônica de varredura e a difração de raios-x avaliaram a organização das fibrilas colágenas estromais, e concluíram que o módulo de elasticidade da córnea está intimamente relacionado ao volume e orientação destas (MEEK et al., 1987; KOMAI; USHIKI, 1991; NEWTON; MEEK, 1998; BOOTE et al., 2003; MEEK; BOOTE, 2004; BOOTE et al., 2005; BOOTE et al., 2006).

Devido à grande dificuldade encontrada na obtenção de amostras de córnea humana para fins científicos, um aumento importante na busca por modelos experimentais tem sido observado. Alguns estudos comparativos entre a córnea humana e a suína vêm sendo publicados, demonstrando a existência de similaridades, com relação ao seu comportamento biomecânico (KAMPMEIER et al., 2000; ZENG et al., 2001; ASEJCZYK-WIDLICKA; PIERSCIONEK, 2008; ELSHEIKH; ALHASSO; RAMA, 2008b).

O emprego da microscopia de força atômica no estudo da córnea já foi ressaltado por vários autores. Alguns estudos, relacionados à avaliação de sua ultraestrutura, foram publicados (MELLER; PETERS; MELLER, 1997; YAMAMOTO et al., 1997; MIYAGAWA et al., 2001; YAMAMOTO et al., 2002).

As propriedades mecânicas das membranas basais da córnea humana também foram avaliadas em estudo recente, por meio da microscopia de força atômica (LAST et al., 2009). Entretanto, o presente estudo é o primeiro destinado a avaliar as propriedades biomecânicas da córnea de suínos, por meio da AFM, em diferentes regiões desta.

A facilidade em se obter as amostras, conforme citado por outros autores, foi observada neste estudo (KAMPMEIER et al., 2000; ZENG et al., 2001; ASEJCZYK-WIDLICKA; PIERSCIONEK, 2008; ELSHEIKH; ALHASSO; RAMA, 2008b). Os olhos

foram obtidos em abatedouro local, apresentando integridade de todas as estruturas oculares e tensão normal.

A mensuração da paquimetria inicial, realizada anteriormente ao preparo das amostras, forneceu valores médios de $798,8 \pm 81,9 \mu\text{m}$ em região central, $791,9 \pm 65,8 \mu\text{m}$ em região superior, $797,1 \pm 75,3 \mu\text{m}$ em região inferior, $749,8 \pm 76,0 \mu\text{m}$ em região nasal e $762,4 \pm 68,6 \mu\text{m}$ em região temporal. Com relação à espessura da região central, estudos prévios conduzidos em olhos de suínos enucleados apresentaram valores semelhantes aos observados em nosso estudo (BARTHOLOMEW et al., 1997; BÖHNKE et al., 1998). Resultados similares, referentes às demais regiões da córnea avaliadas, também foram observados em estudo recente, realizado em suínos *in vivo* (FABER et al., 2008). Tal similaridade, portanto, garante a viabilidade de se utilizar olhos suínos enucleados frescos como modelos experimentais na avaliação da paquimetria corneal.

O presente estudo não evidenciou diferença estatisticamente significativa dentre as regiões da córnea, com relação à paquimetria inicial. Este resultado difere do observado em estudo anterior, realizado em suínos *in vivo*, no qual as regiões pertencentes ao eixo horizontal da córnea (central, nasal e temporal) apresentam menor espessura que as demais regiões, superior e inferior (FABER et al., 2008). Outro estudo, conduzido em olhos suínos enucleados, constatou que a córnea destes animais é mais espessa em sua periferia, divergindo dos nossos achados (BARTHOLOMEW et al., 1997). Estudos conduzidos em humanos, utilizando a tomografia de coerência óptica (OCT) e o topógrafo Orbscan® (Bausch & Lomb, EUA), constataram que a espessura corneal é maior nas regiões superior e temporal, se comparadas às regiões inferiores. (LIU; HUANG; PFLUGFELDER, 1999; LIU; PFLUGFELDER, 2000; HAQUE; JONES; SIMPSON, 2008). Embora haja diferença quanto à espécie avaliada e a técnica utilizada, tais resultados não corroboram com os observados em nosso estudo.

A comparação entre os valores médios das medidas de paquimetria foi realizada com a finalidade de avaliar a influência do processo de preparo da amostras sobre os resultados obtidos. Neste estudo, observou-se que os valores de paquimetria pós-debridamento são menores que as demais medidas, indicando a consequente redução da espessura corneal após a remoção do epitélio.

A similaridade entre os valores médios da paquimetria inicial e pós-dextran demonstrou que o armazenamento em solução de dextran evita a excessiva

hidratação das amostras. Estudos prévios, utilizando soluções de dextran no armazenamento da córnea, não constataram aumento da espessura corneal após períodos de imersão, corroborando com os nossos resultados (TERRY; OUSLEY; ZJHRA, 1994; HAMAOUÏ et al., 2001; BORJA et al., 2004).

Como as propriedades biomecânicas da córnea estão relacionadas basicamente ao estroma corneal (HJORTDAL, 1996; KOTETCHA, 2007), e autores já comprovaram que o epitélio exerce mínimo efeito sobre estas (ELSHEIKH; ALHASSO; RAMA, 2008a), optou-se pelo debridamento da camada epitelial da córnea, com a finalidade de evitar possíveis interferências nos resultados.

Devido ao fato de terem sido incluídos neste estudo animais de diferentes raças e faixas de peso, não se pôde avaliar a variação dos resultados conforme estes parâmetros. Como todos os animais utilizados eram jovens, não foi possível comparar os resultados obtidos em diferentes faixas etárias, como os demais estudos conduzidos em humanos (DAXER et al., 1998; ELSHEIKH et al., 2007).

Os valores médios do módulo de elasticidade obtidos neste estudo foram $0,73 \pm 0,69$ kPa em região central, $0,63 \pm 0,49$ kPa em região superior, $1,14 \pm 1,26$ kPa em região inferior, $1,30 \pm 1,96$ kPa em região nasal e $0,64 \pm 0,36$ em região temporal. Tais resultados diferem bastante dos relatados por outros autores, inclusive em ordem de grandeza (HJORTDAL, 1995,1996; KAMPMEIER et al., 2000; ZENG et al., 2001; JAYASURIYA et al., 2003; LIU; ROBERTS, 2005; ASEJCZYK-WIDLICKA; PIERSCIONEK, 2008; HAMILTON; PYE, 2008).

Para tanto, deve-se levar em consideração a espécie estudada, além da metodologia e técnica empregada. Nos estudos anteriormente citados, foram utilizadas principalmente as técnicas de extensometria (KAMPMEIER et al., 2000; ZENG et al., 2001) e os testes de inflação (HJORTDAL, 1995,1996; ASEJCZYK-WIDLICKA; PIERSCIONEK, 2008), fator que justifica a diferença observada entre os valores obtidos. Além da técnica escolhida, as espécies avaliadas também eram distintas. Alguns autores estudaram córneas humanas, enquanto outros avaliaram córneas de animais da espécie suína. Adicionalmente, dentre os estudos citados, apenas um avaliou córneas humanas normalmente hidratadas, por meio da imersão em solução de dextran (HJORTDAL, 1995). Entretanto, os resultados obtidos por este autor ainda diferem daqueles observados no presente estudo, uma vez que a técnica empregada envolvia testes de inflação.

Valores de módulo de elasticidade similares foram somente relatados em estudo conduzido em córneas humanas, utilizando a AFM. Embora o intuito deste tenha sido avaliar as propriedades biomecânicas das membranas basais da córnea, os autores não excluem a possibilidade de interferência do substrato (estroma) sobre os resultados. Entretanto, algumas particularidades diferenciam as metodologias empregadas no estudo anterior e no presente estudo. Além da diferença quanto às espécies avaliadas, o diâmetro da ponta utilizada foi maior do que o empregado em nosso estudo, e optou-se pela forma esférica em vez de piramidal (LAST et al., 2009).

O emprego de pontas com dimensões menores e formato geométrico diferente pode ter contribuído para a pequena diferença observada entre ambos resultados. Sabe-se que, na avaliação de tecidos macios, é indicada a utilização de pontas esféricas, a fim de minimizar a ocorrência de deformação plástica e evitar danos à amostra (EBENSTEIN; PRUITT, 2006). Adicionalmente, as pontas de diâmetro maior são as mais indicadas na mensuração das propriedades mecânicas de um tecido, uma vez que o analisa como um todo, e não apenas determinadas células ou estruturas (EBENSTEIN; PRUITT, 2004).

Como as fibrilas colágenas estromais apresentam diâmetro aproximado de 25 a 35 nm (KOMAI; USHIKI, 1991), e as pontas utilizadas no presente estudo apresentavam 10 nm de diâmetro, cogitou-se a hipótese de que a mensuração do módulo de elasticidade tenha sido focada a fibrilas colágenas isoladas. Entretanto, autores constataram previamente, por meio da microscopia de força atômica, que o valor do módulo de elasticidade de fibras colágenas do tipo I, proveniente de tendões de ratos, varia entre 5 e 11,5 GPa (WENGER et al., 2007) – diferindo consideravelmente dos nossos resultados.

A solução tampão fosfato (PBS) foi escolhida para imersão da amostra em célula líquida no estudo anterior (LAST et al., 2009). Esta solução, entretanto, não previne a hidratação da amostra como a solução de dextran, utilizada em nosso estudo (TERRY; OUSLEY; ZJHRA, 1994; HAMAOUUI et al., 2001; BORJA et al., 2004). Logo, interferências da hidratação sobre os resultados podem ter ocorrido no estudo citado.

Vale ressaltar que, até o presente momento, não existem relatos em literatura voltados à mensuração do módulo de elasticidade da córnea de suínos, utilizando a microscopia de força atômica.

Comparando-se os resultados obtidos nos olhos direitos com os observados nos olhos esquerdos, não foi constatada diferença estatisticamente significativa quanto às variáveis paquimetria inicial, paquimetria pós-debridamento, paquimetria pós-dextran, micrometria e módulo de elasticidade. Estes dados complementam estudos anteriores conduzidos em humanos, os quais não constataram diferença significativa, quanto à paquimetria central, dentre os olhos contralaterais (NISSEN et al., 1991; WOLFS et al., 1997; WONG et al., 2002).

Uma importante simetria entre os dois olhos, com relação à orientação das fibrilas colágenas estromais, foi relatada anteriormente (BOOTE et al., 2006). Como as propriedades biomecânicas da córnea estão intimamente relacionadas ao volume e orientação destas (BOOTE et al., 2005), era esperado que a simetria se manifestasse também com relação ao módulo de elasticidade.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que:

1. O armazenamento de amostras de córnea em solução de dextran previne a hidratação excessiva destas, mantendo a paquimetria dentro dos valores considerados normais.
2. Tanto a paquimetria quanto o módulo de elasticidade corneanos não variam dentre as regiões central, superior, inferior, nasal e temporal da córnea.
3. A espessura e a elasticidade da córnea não diferem frente à comparação de olhos contralaterais.
4. Devido à facilidade de aquisição e aos resultados obtidos, a córnea suína pode ser empregada como modelo experimental na avaliação das propriedades biomecânicas corneanas.

REFERÊNCIAS

- ALIÓ, J. L.; AGDEPPA, M. C.; RODRÍGUEZ-PRATS, J. L.; AMPARO, F.; PIÑERO, D. P. Factors influencing corneal biomechanical changes after microincision cataract surgery and standard coaxial phacoemulsification. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 36, n. 6, p. 890-897, 2010.
- ALONSO, J. L.; GOLDMANN, W. H. Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology. **Life Sciences**, v. 72, n. 23, p. 2553-2560, 2003.
- ANDREASSEN, T. T.; SIMONSEN, A. H.; OXLUND, H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. **Experimental Eye Research**, v. 31, n. 4, p. 435-441, 1980.
- ASEJCZYK-WIDLICKA, M.; PIERSCIONEK, B. K. The elasticity and rigidity of the outer coats of the eye. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 92, n. 10, p. 1415-1418, 2008.
- ASHBY, P. D.; CHEN, L.; LIEBER, C. M. Probing intermolecular forces and potentials with magnetic feedback chemical force microscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 39, p. 9467-9472, 2000.
- BARTHOLOMEW, L. R.; PANG, D. X.; SAM, D. A.; CAVENDER, J. C. Ultrasound biomicroscopy of globes from young adult pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 9, p. 942-948, 1997.
- BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscope. **Physical Review Letters**, v. 56, n. 9, p. 930, 1986.
- BINNIG, G.; ROHRER, H.; GERBER, C.; WEIBEL, E. Surface studies by scanning tunneling microscopy. **Physical Review Letters**, v. 49, n. 1, p. 57-61, 1982.
- BÖHNKE, M.; CHAVANNE, P.; GIANOTTI, R.; SALATHÉ, R. P. Continuous non-contact corneal pachymetry with a high speed reflectometer. **Journal of Refractive Surgery**, v. 14, n. 2, p. 140-146, 1998.

BOOTE, C.; DENNIS, S.; HUANG, Y.; QUANTOCK, A. J.; MEEK, K. M. Lamellar orientation in human cornea in relation to mechanical properties. **Journal of Structural Biology**, v. 149, n. 1, p. 1-6, 2005.

BOOTE, C.; DENNIS, S.; NEWTON, R. H.; PURI, H.; MEEK, K. M. Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: optical and biomechanical implications. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 7, p. 2941-2948, 2003.

BOOTE, C.; HAYES, S.; ABAHUSSIN, M.; MEEK, K. M. Mapping collagen organization in the human cornea: left and right eyes are structurally distinct. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 3, p. 901-908, 2006.

BORJA, D.; MANNS, F.; LAMAR, P.; ROSEN, A.; FERNANDEZ, V.; PAREL, J. M. Preparation and hydration control of corneal tissue strips for experimental use. **Cornea**, v. 23, n. 1, p. 61-66, 2004.

BUSHELL, G. R.; CAHILL, C.; CLARKE, F. M.; GIBSON, C. T.; MYHRA, S.; WATSON, G. S. Imaging and force-distance analysis of human fibroblasts in vitro by atomic force microscopy. **Cytometry**, v. 36, n. 3, p. 254-264, 1999.

CHEN, M. C.; LEE, N.; BOURLA, N.; HAMILTON, D. R. Corneal biomechanical measurements before and after laser in situ keratomileusis. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 34, n. 11, p. 1886-1891, 2008.

DAMMER, U.; POPESCU, O.; WAGNER, P.; ANSELMETTI, D.; GÜNTHERODT, H. J.; MISEVIC, G. N. Binding strength between cell adhesion proteoglycans measured by atomic force microscopy. **Science**, v. 267, n. 5201, p. 1173-1175, 1995.

DANIELSEN, C. C. Tensile mechanical and creep properties of Descemet's membrane and lens capsule. **Experimental Eye Research**, v. 79, n. 3, p. 343-350, 2004.

DAXER, A.; MISOF, K.; GRABNER, B.; ETTL, A.; FRATZL, P. Collagen fibrils in the human corneal stroma: structure and aging. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 39, n. 3, p. 644-648, 1998.

DRAKE, B.; PRATER, C. B.; WEISENHORN, A. L.; GOULD, S. A.; ALBRECHT, T. R.; QUATE, C. F.; CANNELL, D. S.; HANSMA, H. G.; HANSMA, P. K. Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope. **Science**, v. 243, n. 4898, p. 1586-1589, 1989.

DUCKER, W. A.; SENDEN, T. J.; PASHLEY, R. M. Direct measurement of colloidal forces using an atomic force microscope **Nature**, v. 353, n., p. 239-241, 1991.

DULINSKA, I.; TARGOSZ, M.; STROJNY, W.; LEKKA, M.; CZUBA, P.; BALWIERZ, W.; SZYMONSKI, M. Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 66, n. 1-3, p. 1-11, 2006.

EBENSTEIN, D. M.; PRUITT, L. A. Nanoindentation of biological materials. **Nanotoday**, v. 1, n. 3, p. 26-33, 2006.

EBENSTEIN, D. M.; PRUITT, L. A. Nanoindentation of soft hydrated materials for application to vascular tissues. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 69A, n. 2, p. 222-232, 2004.

EDMUND, C. Corneal elasticity and ocular rigidity in normal and keratoconic eyes. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 66, n. 2, p. 134-140, 1988.

ELSHEIKH, A.; ALHASSO, D.; RAMA, P. Assessment of the epithelium's contribution to corneal biomechanics. **Experimental Eye Research**, v. 86, n. 2, p. 445-451, 2008a.

ELSHEIKH, A.; ALHASSO, D.; RAMA, P. Biomechanical properties of human and porcine corneas. **Experimental Eye Research**, v. 86, n. 5, p. 783-790, 2008b.

ELSHEIKH, A.; ANDERSON, K. Comparative study of corneal strip extensometry and inflation tests. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 2, n. 3, p. 177-185, 2005.

ELSHEIKH, A.; WANG, D.; BROWN, M.; RAMA, P.; CAMPANELLI, M.; PYE, D. Assessment of corneal biomechanical properties and their variation with age. **Current Eye Research**, v. 32, n. 1, p. 11-19, 2007.

FABER, C.; SCHERFIG, E.; PRAUSE, J. U.; SORENSEN, K. E. Corneal thickness in pigs measured by ultrasound pachymetry in vivo. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 35, n. 1, p. 39-43, 2008.

FINOT, M. O.; MCDERMOTT, M. T. High-resolution chemical mapping of surface bound functional groups with tapping-mode scanning force microscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 36, p. 8564-8565, 1997.

FLORIN, E. L.; MOY, V. T.; GAUB, H. E. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 415-417, 1994.

GADEGAARD, N. Atomic force microscopy in biology: technology and techniques. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 81, n. 2-3, p. 87-97, 2006.

GEFEN, A.; SHALOM, R.; ELAD, D.; MANDEL, Y. Biomechanical analysis of the keratoconic cornea. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 2, n. 3, p. 224-236, 2009.

GOLDICH, Y.; BARKANA, Y.; GERBER, Y.; RASKO, A.; MORAD, Y.; HARSTEIN, M.; AVNI, I.; ZADOK, D. Effect of diabetes mellitus on biomechanical parameters of the cornea. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 35, n. 4, p. 715-719, 2009.

GOULD, S.; MARTI, O.; DRAKE, B.; HELLEMANS, L.; BRACKER, C. E.; HANSMA, P. K.; KEDER, N. L.; EDDY, M. M.; STUCKY, G. D. Molecular resolution images of amino acid crystals with atomic force microscope. **Nature**, v. 332, n., p. 332-334, 1988.

GRAFSTRÖM, S.; ACKERMANN, J.; HAGEN, T.; NEUMANN, R.; PROBST, O. Analysis of lateral force effects on the topography in scanning force microscopy **Journal of Vacuum Science & Technology B**, v. 12, n. 3, p. 1559-1564, 1994.

GUM, G. G.; GELATT, K. N.; ESSON, D. W. Physiology of the eye. In: GELATT, K. N. (Ed.). **Veterinary ophthalmology**. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. v.1, p.149-182.

HAGER, A.; WEGSCHEIDER, K.; WIEGAND, W. Changes of extracellular matrix of the cornea in diabetes mellitus. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 247, n. 10, p. 1369-1374, 2009.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. Equilíbrio e elasticidade. In: HALLIDAY, D. (Ed.). **Fundamentos da física**. Rio de Janeiro: LTC, 1996. v.2, p.1-23.

HAMAOU, M.; TAHI, H.; CHAPON, P.; DUCHESNE, B.; FANTES, F.; FEUER, W.; PAREL, J. M. Corneal preparation of eye bank eyes for experimental surgery. **Cornea**, v. 20, n. 3, p. 317-320, 2001.

HAMILTON, K. E.; PYE, D. C. Young's modulus in normal corneas and the effect on applanation tonometry. **Optometry and Vision Science**, v. 85, n. 6, p. 445-450, 2008.

HANSMA, P. K.; CLEVELAND, J. P.; RADMACHER, M.; WALTERS, D. A.; HILLNER, P. E.; BEZANILLA, M.; FRITZ, M.; VIE, D.; HANSMA, H. G.; PRATER, C. B.; MASSIE, J.; FUKUNAGA, L.; GURLEY, J.; ELINGS, V. Tapping mode atomic force microscopy in liquids. **Applied Physics Letters**, v. 64, n. 13, p. 1738-1740, 1994.

HAQUE, S.; JONES, L.; SIMPSON, T. Thickness mapping of the cornea and epithelium using optical coherence tomography. **Optometry and Vision Science**, v. 85, n. 10, p. E963-976, 2008.

HENNIGHAUSEN, H.; FELDMAN, S. T.; BILLE, J. F.; MCCULLOCH, A. D. Anterior-posterior strain variation in normally hydrated and swollen rabbit cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 39, n. 2, p. 253-262, 1998.

HEUBERGER, M.; DIETLER, G.; SCHLAPBACH, L. Elastic deformations of tip and sample during atomic force microscope measurements. **Journal of Vacuum Science & Technology B**, v. 14, n. 2, p. 1250-1254, 1996.

HJORTDAL, J. O. Extensibility of the normo-hydrated human cornea. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 73, n. 1, p. 12-17, 1995.

HJORTDAL, J. O. On the biomechanical properties of the cornea with particular reference to refractive surgery. **Acta Ophthalmologica Scandinavica. Supplement**, v. 76, n. S225, p. 1-23, 1998.

HJORTDAL, J. O. Regional elastic performance of the human cornea. **Journal of Biomechanics**, v. 29, n. 7, p. 931-942, 1996.

JAYASURIYA, A. C.; GHOSH, S.; SCHEINBEIM, J. I.; LUBKIN, V.; BENNETT, G.; KRAMER, P. A study of piezoelectric and mechanical anisotropies of the human cornea. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 18, n. 4, p. 381-387, 2003.

KAMIYA, K.; SHIMIZU, K.; OHMOTO, F. Comparison of the changes in corneal biomechanical properties after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. **Cornea**, v. 28, n. 7, p. 765-769, 2009.

KAMPMEIER, J.; RADT, B.; BIRNGRUBER, R.; BRINKMANN, R. Thermal and biomechanical parameters of porcine cornea. **Cornea**, v. 19, n. 3, p. 355-363, 2000.

KOMAI, Y.; USHIKI, T. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 32, n. 8, p. 2244-2258, 1991.

KOTECHA, A. What biomechanical properties of the cornea are relevant for the clinician? **Survey of Ophthalmology**, v. 52 n. 6 p. S109-114, 2007.

KUCUMEN, R. B.; YENEREL, N. M.; GORGUN, E.; KULACOGU, D. N.; ONCEL, B.; KOHEN, M. C.; ALIMGIL, M. L. Corneal biomechanical properties and intraocular pressure changes after phacoemulsification and intraocular lens implantation. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 34, n. 12, p. 2096-2098, 2008.

KUZNETSOVA, T. G.; STARODUBTSEVA, M. N.; YEGORENKOV, N. I.; CHIZHIK, S. A.; ZHDANOV, R. I. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. **Micron (Oxford, England : 1993)**, v. 38, n. 8, p. 824-833, 2007.

LAST, J. A.; LILIENSIEK, S. J.; NEALEY, P. F.; MURPHY, C. J. Determining the mechanical properties of human corneal basement membranes with atomic force microscopy. **Journal of Structural Biology**, v. 167, n. 1, p. 19-24, 2009.

LIN, D. C.; DIMITRIADIS, E. K.; HORKAY, F. Robust strategies for automated AFM force curve analysis - I. Non-adhesive indentation of soft, inhomogeneous materials. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 129, n., p. 430-440, 2007.

LIU, J.; ROBERTS, C. J. Influence of corneal biomechanical properties on intraocular pressure measurement: quantitative analysis. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 31, n. 1, p. 146-155, 2005.

LIU, Z.; HUANG, A. J.; PFLUGFELDER, S. C. Evaluation of corneal thickness and topography in normal eyes using the Orbscan corneal topography system. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 83, n. 7, p. 774-778, 1999.

LIU, Z.; PFLUGFELDER, S. C. The effects of long-term contact lens wear on corneal thickness, curvature, and surface regularity. **Ophthalmology**, v. 107, n. 1, p. 105-111, 2000.

LYDATAKI, S.; LESNIEWSKA, E.; TSILIMBARIS, M. K.; LE GRIMELLEC, C.; ROCHETTE, L.; GOUDONNET, J. P.; PALLIKARIS, I. G. Observation of the posterior endothelial surface of the rabbit cornea using atomic force microscopy. **Cornea**, v. 22, n. 7, p. 651-664, 2003.

MARTI, O.; DRAKE, B.; HANSMA, P. K. Atomic force microscopy of liquid-covered surfaces: atomic resolution images. **Applied Physics Letters**, v. 51, n. 7, p. 484-486, 1987.

MEEK, K. M.; BLAMIRE, T.; ELLIOTT, G. F.; GYI, T. J.; NAVE, C. The organisation of collagen fibrils in the human corneal stroma: A synchrotron X-ray diffraction study. **Current Eye Research**, v. 6, n. 7, p. 841-846, 1987.

MEEK, K. M.; BOOTE, C. The organization of collagen in the corneal stroma. **Experimental Eye Research**, v. 78, n. 3, p. 503-512, 2004.

MEEK, K. M.; TUFT, S. J.; HUANG, Y.; GILL, P. S.; HAYES, S.; NEWTON, R. H.; BRON, A. J. Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 6, p. 1948-1956, 2005.

MELLER, D.; PETERS, K.; MELLER, K. Human cornea and sclera studied by atomic force microscopy. **Cell and Tissue Research**, v. 288, n. 1, p. 111-118, 1997.

MIYAGAWA, A.; KOBAYASHI, M.; FUJITA, Y.; HAMDY, O.; HIRANO, K.; NAKAMURA, M.; MIYAKE, Y. Surface ultrastructure of collagen fibrils and their association with proteoglycans in human cornea and sclera by atomic force

microscopy and energy-filtering transmission electron microscopy. **Cornea**, v. 20, n. 6, p. 651-656, 2001.

NAKAMURA, M. **Investigação estrutural de filmes moleculares por microscopia de varredura por força**. 2007. 150p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

NEWTON, R. H.; MEEK, K. M. The integration of the corneal and limbal fibrils in the human eye **Biophysical Journal**, v. 75, n. 5, p. 2508-2512, 1998.

NISSEN, J.; HJORTDAL, J. O.; EHLERS, N.; FROST-LARSEN, K.; SORENSEN, T. A clinical comparison of optical and ultrasonic pachometry. **Acta Ophthalmologica**, v. 69, n. 5, p. 659-663, 1991.

ORTIZ, D.; PIÑERO, D.; SHABAYEK, M. H.; ARNALICH-MONTIEL, F.; ALIÓ, J. L. Corneal biomechanical properties in normal, post-laser in situ keratomileusis, and keratoconic eyes. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 33, n. 8, p. 1371-1375, 2007.

PAROT, P.; DUFRENE, Y. F.; HINTERDORFER, P.; LE GRIMELLEC, C.; NAVAJAS, D.; PELLEQUER, J. L.; SCHEURING, S. Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine. **Journal of Molecular Recognition**, v. 20, n. 6, p. 418-431, 2007.

PUTMAN, C. A. J.; WETF, K. V.; GROOTH, B. G.; HULST, N. F. V.; GREVE, J. Tapping mode atomic force microscopy in liquid. **Applied Physics Letters**, v. 64, n. 18, p. 2454-2456, 1994.

RADMACHER, M.; FRITZ, M.; KACHER, C. M.; CLEVELAND, J. P.; HANSMA, P. K. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. **Biophysical Journal**, v. 70, n. 1, p. 556-567, 1996.

ROBERTS, C. Biomechanics of the cornea and wavefront-guided laser refractive surgery. **Journal of Refractive Surgery**, v. 18, n. 5, p. S589-592, 2002.

ROSENBLUTH, M. J.; LAM, W. A.; FLETCHER, D. A. Force microscopy of nonadherent cells: a comparison of leukemia cell deformability. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 8, p. 2994-3003, 2006.

SAMUELSON, D. A. Ophthalmic anatomy. In: GELATT, K. N. (Ed.). **Veterinary ophthalmology**. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. v.1, p.37-148.

SAMUELSON, D. A. Ophthalmic embriology and anatomy. In: GELATT, K. N. (Ed.). **Veterinary ophthalmology**. Philadelphia: Lea & Febirger, 1991. v.1, p.3-123.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy. **Biophysical Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 133-149, 2004.

SEILER, T.; MATAALLANA, M.; SENDLER, S.; BENDE, T. Does Bowman's layer determine the biomechanical properties of the cornea? **Refractive & Corneal Surgery**, v. 8, n. 2, p. 139-142, 1992.

SHAO, Z.; YANG, J.; SOMLYO, A. P. Biological atomic force microscopy: from microns to nanometers and beyond. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 11, n., p. 241-265, 1995.

SHIN, T. J.; VITO, R. P.; JOHNSON, L. W.; MCCAREY, B. E. The distribution of strain in the human cornea. **Journal of Biomechanics**, v. 30, n. 5, p. 497-503, 1997.

SIMON, A.; COHEN-BOUHACINA, T.; PORTE, V. C.; AIME, J. P.; AMEDEE, J.; BAREILLE, R.; BAQUEY, C. Characterization of dynamic cellular adhesion of osteoblasts using atomic force microscopy. **Cytometry**, v. 54, n. 1, p. 36-47, 2003.

SLATTER, D. H. Cornea and sclera. In: SLATTER, D. H. (Ed.). **Fundamentals of veterinary ophthalmology**. Philadelphia: Saunders, 2001, p.260-313.

TERRY, M. A.; OUSLEY, P. J.; ZJHRA, M. L. Hydration changes in cadaver eyes prepared for practice and experimental surgery. **Archives of Ophthalmology**, v. 112, n. 4, p. 538-543, 1994.

TOUBOUL, D.; ROBERTS, C.; KÉRAUTRET, J.; GARRA, C.; MAURICE-TISON, S.; SAUBUSSE, E.; COLIN, J. Correlations between corneal hysteresis, intraocular pressure, and corneal central pachymetry. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 34, n. 4, p. 616-622, 2008.

TSILIMBARIS, M. K.; LESNIEWSKA, E.; LYDATAKI, S.; LE GRIMELLEC, C.; GOUDONNET, J. P.; PALLIKARIS, I. G. The use of atomic force microscopy for the

observation of corneal epithelium surface. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 3, p. 680-686, 2000.

VINCKIER, A.; SEMENZA, G. Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. **FEBS Letters**, v. 430, n. 1-2, p. 12-16, 1998.

WEISENHORN, A. L.; KHORSANDI, M.; KASAS, S.; GOTZOS, V.; BUTT, H. J. Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM. **Nanotechnology**, v. 4, n. 2, p. 106-113, 1993.

WENGER, M. P. E.; BOZEC, L.; HORTON, M. A.; MESQUIDA, P. Mechanical properties of collagen fibrils. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 4, p. 1255-1263, 2007.

WILSON, S. E.; HONG, J. W. Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. **Cornea**, v. 19, n. 4, p. 417-420, 2000.

WOLFS, R. C.; KLAVER, C. C.; VINGERLING, J. R.; GROBBEE, D. E.; HOFMAN, A.; DE JONG, P. T. Distribution of central corneal thickness and its association with intraocular pressure: The Rotterdam Study. **American Journal of Ophthalmology**, v. 123, n. 6, p. 767-772, 1997.

WONG, A. M.; WONG, C. C.; YUEN, N. Y.; HUI, S. P. Correlational study of central corneal thickness measurements on Hong Kong Chinese using optical coherence tomography, Orbscan and ultrasound pachymetry. **Eye (Lond)**, v. 16, n. 6, p. 715-721, 2002.

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 of Ophthalmology**, v. 46, n. 5, p. 496-501, 2002.

YAMAMOTO, S.; HITOMI, J.; SHIGENO, M.; SAWAGUCHI, S.; ABE, H.; USHIKI, T. Atomic force microscopic studies of isolated collagen fibrils of the bovine cornea and sclera. **Archives of Histology and Cytology**, v. 60, n. 4, p. 371-378, 1997.

YAMANE, Y.; SHIGA, H.; HAGA, H.; KAWABATA, K.; ABE, K.; ITO, E. Quantitative analyses of topography and elasticity of living and fixed astrocytes. **Journal of electron microscopy**, v. 49, n. 3, p. 463-471, 2000.

YOUNG, H. D.; FREEDMAN, R. G. Equilíbrio e elasticidade. In: YOUNG, H. D. ;FREEDMAN, R. G. (Ed.). **Física I**. São Paulo: Addison Wesley, 2008, p.355-385.

ZENG, Y.; YANG, J.; HUANG, K.; LEE, Z.; LEE, X. A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. **Journal of Biomechanics**, v. 34, n. 4, p. 533-537, 2001.

ZHONG, Q.; INNISS, D.; KJOLLER, K.; ELINGS, V. B. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. **Surface Science Letters**, v. 290, n. 1-2, p. 688-692, 1993.

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, n., p. 504-510, 2007.