

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA

Caracterização Morfológica de tecidos oculares por
Microscopia de Força Atômica (MFA)

Fernanda Virgínia Gozzo

Orientador: Prof. Dr. Sergio Luiz Morelhão

Dissertação de mestrado apresentada ao
Instituto de Física para a obtenção do
título de Mestre em Ciências

São Paulo

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA

Caracterização Morfológica de tecidos oculares por
Microscopia de Força Atômica (MFA)

Fernanda Virgínia Gozzo

Orientador: Prof. Dr. Sergio Luiz Morelhão

Dissertação de mestrado apresentada ao
Instituto de Física para a obtenção do
título de Mestre em Ciências

Aprovada pela banca examinadora:

Prof. Dr. Sérgio Luiz Morelhão (Orientador) - IFUSP
Prof. Dra. Maria Cecília Barbosa da Silveira Salvadori - IFUSP
Prof. Dra. Martha Simões Ribeiro - IPEN

São Paulo

2009

Agradecimentos

Agradeço...

Primeiramente Dra. Andrea Antunes pela incrível colaboração neste trabalho, tornando-o possível e contribuindo imensamente com meu aprendizado.

Meu orientador Prof. Dr. Sergio Morelhão por imenso apoio que permitiu a conclusão deste trabalho.

Os colaboradores do laboratório de Endocrinologia de Peixes do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Prof. Dra. Maria Ines Borella e Antonio Cruz.

Os colaboradores do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Henrique Eisi Toma e Dr. Marcelo Nakamura.

Os colaboradores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Paulo Barros e Prof. Dra. Angélica Safatle.

A família, os amigos e colegas de trabalho que incentivaram e auxiliaram a tornar este trabalho possível.

Agradeço ao órgão de fomento CNPq pelo apoio financeiro prestado durante o período de abril de 2006 a janeiro de 2008.

Resumo

Neste trabalho foi investigado através da Microscopia de Força Atômica (MFA) a topografia de tecidos oculares, dentre eles, cristalinos e córneas e doenças associadas. O principal objetivo foi o desenvolvimento de metodologia apropriada para a caracterização do cristalino para distintos estágios de maturação da catarata. A metodologia foi estendida para a avaliação do sequestro de córnea e foram obtidas imagens para grupos de tecidos saudáveis e com doença. Foi obtida uma comparação entre as imagens obtidas com MFA e análise histológica. Por fim, confirmou-se a aplicabilidade do MFA para caracterização estrutural de tecidos oculares mencionados.

Abstract

In this work it was investigated through Atomic Force Microscopy (AFM) the topography of ocular tissues, crystalline lenses and corneal and associated pathologies. The main objective is the improvement of an appropriated methodology to crystalline lenses characterization and the distinct stages of cataract. The methodology was extended to corneal sequestrum assessments and it was obtained images to groups of healthy and diseased tissues. A comparison between the AFM and histological analysis was obtained. The AFM applicability was confirmed to structural characterization of ocular tissues.

Sumário

Resumo	2
Abstract	3
1 Estado da Arte	6
2 Objetivos	13
3 Materiais e Métodos	15
3.1 Cristalino: A lente natural do olho	15
3.1.1 Catarata: Principal patologia associada à lente	23
3.2 Outros tecidos oculares: Córnea	26
3.2.1 Sequestro de córnea	28
3.3 Análise histológica	29
3.4 Microscópio de Força Atômica (MFA)	33
3.4.1 Modos de operação	37
3.4.2 Propriedades Mecânicas através da Microscopia de Força Modulada (MFM)	41
4 Parte experimental	44
4.1 Preparação dos tecidos oculares para análise histológica	45
4.1.1 Preparação histológica através da inclusão em parafina	45
4.1.2 Preparação histológica através da inclusão em resina	46
4.2 Preparação dos tecidos oculares para análise topográfica com o MFA	46
4.3 Equipamento	47

<i>SUMÁRIO</i>	5
4.4 Resumo das preparações	48
5 Resultados	52
5.1 Avaliação estrutural do cristalino por Histologia e MFA	52
5.1.1 Estruturas básicas do cristalino	52
5.1.2 Catarata Imatura	58
5.1.3 Catarata Madura	64
5.1.4 Catarata Hipermatura	69
5.2 Análise estrutural da córnea por Histologia e MFA	78
6 Discussões e Conclusões	89
Referências Bibliográficas	99

Capítulo 1

Estado da Arte

A catarata, doença que se caracteriza pela opacidade parcial ou total do cristalino, representa a principal causa de cegueira reversível no mundo, ver figura 1.1. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que a doença atinge quase metade (48%) da população mundial com mais de 65 anos [1, 2]. Estima-se que no mundo 160 milhões de pessoas tenham a doença. No Brasil são 2 milhões e surgem 120 mil novos casos ao ano.

Com alta incidência também em animais, a catarata é uma patologia para a qual não há cura. Uma vez diagnosticada, o tratamento é a intervenção cirúrgica [3, 4]. No caso de cirurgia de catarata em humanos, o cristalino afetado é substituído por uma lente intra-ocular (LIO) com propriedades ópticas e mecânicas similares ao cristalino original [5, 6]. Em animais, a cirurgia envolve a retirada do cristalino acometido pela doença, através da cirurgia de extração extra-capsular (EEC) [7] e o preenchimento da cavidade por solução salina balanceada com propriedades similares ao humor aquoso [8]. A catarata possui distintos estágios de evolução [9, 10] e uma avaliação detalhada destes foi realizada com o uso de técnicas morfológicas a fim de estudar mudanças intrínsecas da patologia, além de avaliar como a doença em seus distintos graus.

A catarata se caracteriza por ser a principal patologia cristalino, um tecido ocular cuja estrutura resume-se à camada epitelial, córtex e núcleo, como ilustrado na figura 1.2, sendo estas duas últimas estruturas compostas por fibras alongadas cujas terminações são limitadas pela camada epitelial, formando camadas concêntricas [11, 12]. O crista-

lino, bem como suas estruturas primárias, é descrito mais adiante, na seção de materiais e métodos.

Tecidos oculares têm sido analisados por diversas técnicas devido à complexidade das estruturas que os compõem e à incidência de patologias associadas as quais alteram a composição primária dos tecidos, comprometendo suas funções ópticas e fisiológicas [13, 14, 15, 16, 17]. Tecidos tais como a córnea, a esclera e o cristalino foram estudados por distintas técnicas morfológicas, como a histologia, microscopia eletrônica, entre outras, a fim de caracterizar suas estruturas, além de avaliar as alterações ocorrentes devido à incidência de patologias associadas a cada tipo de tecido [18, 19].

A histologia é a principal e mais antiga técnica morfológica, muito utilizada para a caracterização de tecidos e células em geral. É necessária uma preparação dos tecidos previamente para a observação através do Microscópio Óptico (MO) [20]. É muito utilizada atualmente, entretanto apresenta a desvantagem de ser demorada devido às várias etapas de preparação as quais o tecido deve ser submetido. Mesmo assim, a histologia tem ampla aplicação em diversas áreas, tais como a bioquímica e fisiologia, fornecendo dados para a compreensão de fenômenos patológicos e suas causas [20, 21]. Neste estudo, a histologia foi utilizada como uma técnica complementar para a comparação com as imagens obtidas por outras técnicas morfológicas, bem como a comprovação dos resultados.

Além da MO, publicações seguintes apresentaram a microscopia eletrônica como uma técnica em potencial para a avaliação morfológica. Muitos estudos utilizando tecidos oculares foram realizados através da microscopia eletrônica [17, 22, 23]. Avaliações morfológicas foram realizadas em diversas pesquisas com o cristalino sadio e acometido com catarata em diversos graus [24, 25, 26, 27, 28], além de outros tecidos oculares tais como a córnea e a esclera [29]. Entretanto, a técnica de microscopia eletrônica exige preparações prévias do tecido, as quais despendem tempo devido às preparações necessárias, já que o equipamento tem seu funcionamento em vácuo, a fim de que o feixe eletrônico interaja com a amostra sem a interferência de outras partículas no ambiente da medida [30, 31]. A microscopia eletrônica exige que a amostra seja então preparada para suportar o vácuo e a interação eletrônica, sendo devidamente desidratada, preenchida com material eletronicamente denso e a superfície recoberta com substância condutora

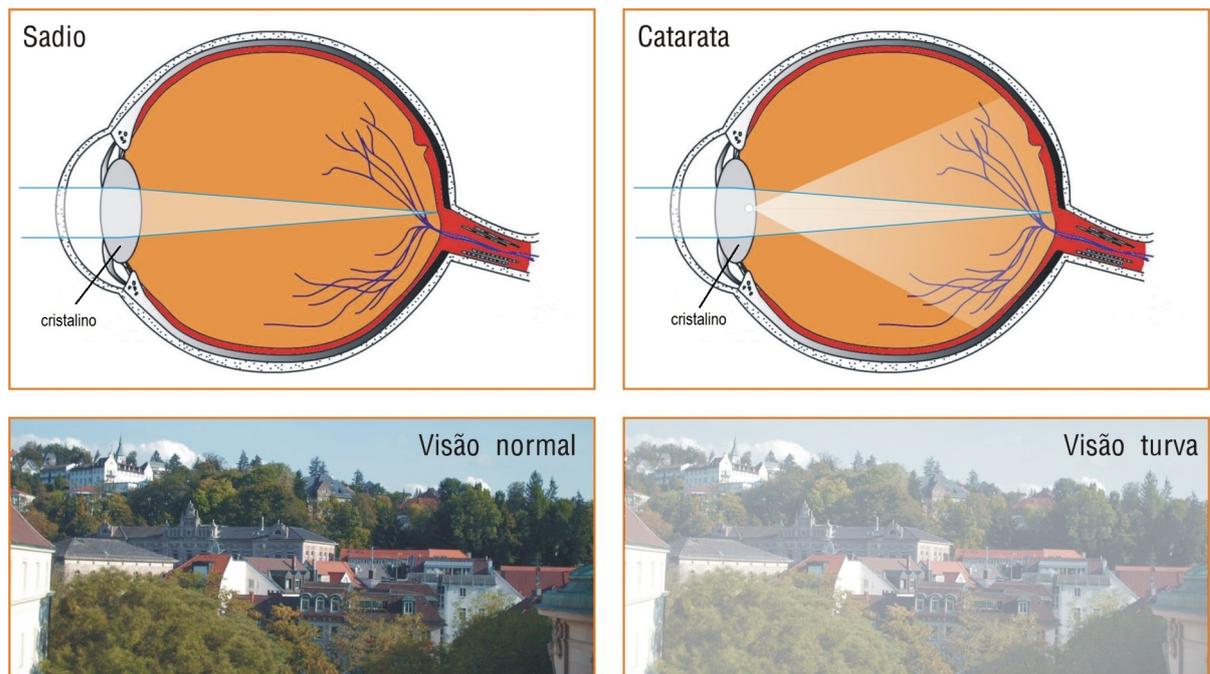


Figura 1.1: A função do cristalino é focalizar a luz dos objetos na retina, tornando-os nítidos. Quando acometido pela catarata, alterações no tecido do cristalino passam a atuar como centros espalhadores de luz, prejudicando a visão e podendo levar à cegueira total.

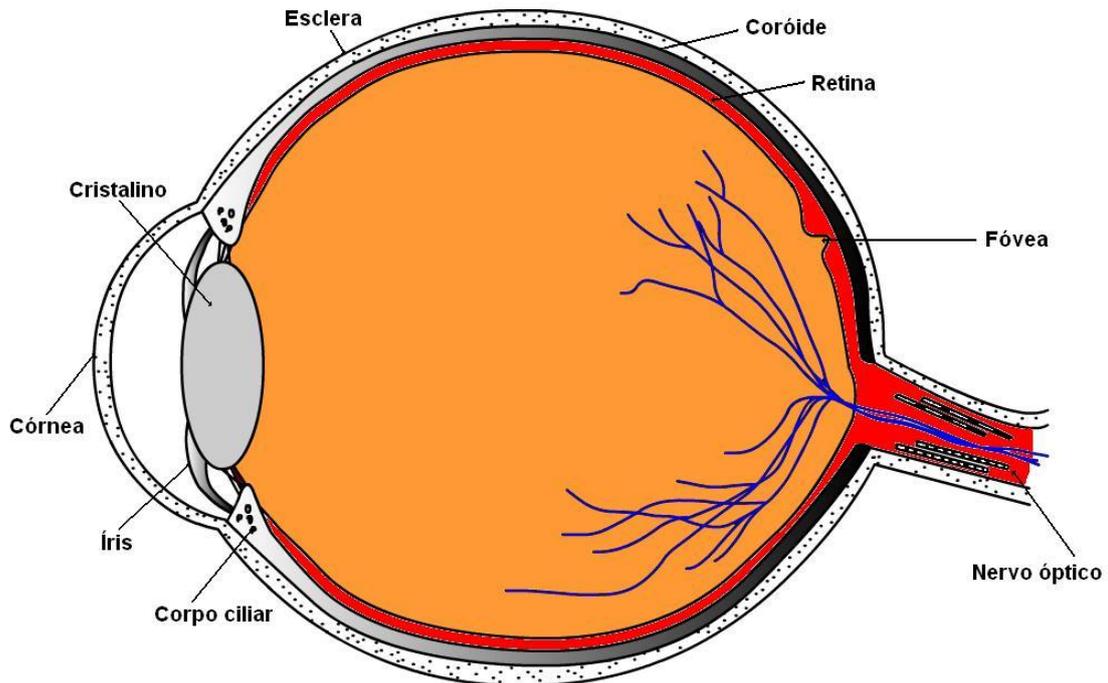


Figura 1.2: Sistema ocular e suas principais estruturas.

Apesar da disponibilidade das várias técnicas morfológico-estruturais capazes de analisar tecidos em escalas micrométricas e sub-micrométricas, limitações inerentes às técnicas são ainda presentes dificultando o processo de caracterização das patologias. O cristalino enquadra-se neste caso, além de sua extensão dimensional, a própria opacidade presente com a catarata dificulta ainda mais a identificação exata da posição, distribuição e tamanho dos centros espalhadores causadores da perda de transparência. Quanto mais simples e céleres os processos de preparação dos tecidos para análise, maiores as possibilidades de estabelecer correlações estatísticas entre as alterações dos tecidos e os fatores de causa da patologia.

Uma alternativa para análise é o uso de imagens de raios X. Devido ao curto comprimento de onda dessa radiação eletromagnética, comparado ao da luz visível, ela sofre um espalhamento muito pequeno ao ser transmitida pelo tecido, possibilitando assim caracterizar a ocorrência de alterações distintas em toda a extensão do cristalino, como pode ser visto nas imagens mostradas na figura 1.3. Porém, como a resolução das imagens

de raios X é da ordem de dezenas de micrômetros, permanece ainda a necessidade de uma análise em maior resolução da natureza intrínseca das distintas alterações presentes nos tecidos acometidos pela catarata.

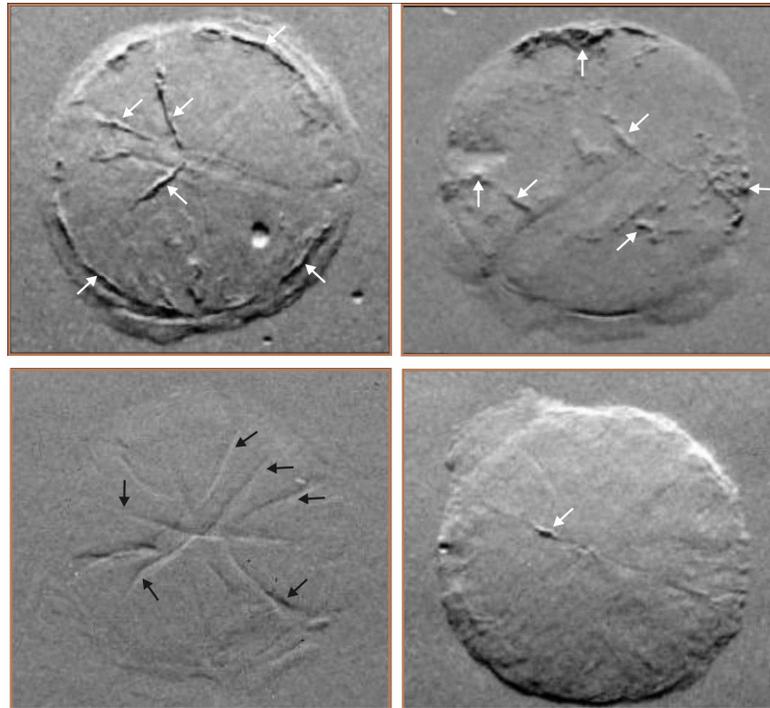


Figura 1.3: Imagens de cristalinolitos inteiros (dimensões de aproximadamente 2 cm de diâmetro), obtidas por radiografia de raios X de luz Síncrotron. Presença de cálcio (setas brancas) na região cortical são presentes na maioria dos casos de catarata parcial, enquanto que fissuras radiais (setas pretas) devido à compactação de fibras celulares são observadas nos casos de catarata total independentemente da ocorrência da presença de cálcio. Veja referência [34] para maiores detalhes.

A microscopia de força atômica (MFA) apresentou-se como uma técnica em potencial utilizada para a caracterização morfológica de tecidos biológicos, segundo publicações. A técnica foi desenvolvida em 1986 inicialmente para as ciências dos materiais e tratando-se de um equipamento pertencente à família dos microscópios os quais se utilizam de uma ponta para gerar a imagem da amostra, sem o uso de lentes [35]. Ao longo dos anos, o MFA foi se tornando mais utilizado na área de ciências biológicas, já que a técnica permite a obtenção de imagens topográficas tridimensionais de materiais não

condutores e sem o uso do vácuo durante a observação, ou seja, as imagens podem ser geradas em condições fisiológicas e em temperatura ambiente. Tal fato possibilitou muitos biólogos e especialistas da área a utilizar o MFA no estudo de amostras biológicas, gerando trabalhos publicados os quais introduziram avanços na área biológica com a utilização do equipamento [36, 37, 38].

Alguns autores apresentaram resultados de pesquisa com o uso do MFA para tecidos oculares tais como a córnea e esclera, tais resultados apresentaram-se claramente compatíveis com análise histológicas previamente preparadas. Avaliações estruturais de fibrilas de colágeno da córnea e esclera foram realizadas através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV) [3, 4, 18], além do MFA, este último ofereceu diversas vantagens quanto à análise, tais como resolução molecular, mínima preparação de amostras, sem necessidade de recobrimento metálico como para MET ou MEV. O MFA também apresentou informações quantitativas acerca da altura e largura das amostras.

Em geral, as contribuições do MFA para o estudo de amostras biológicas são ressaltadas ao se comparar o seu custo-benefício com o de técnicas mais consagradas, ou seja, uma comparação da viabilidade da preparação de amostras versus a qualidade dos resultados apresentam o MFA como uma técnica em potencial para avaliação topográfica de amostras biológicas.

O MFA, além de gerar imagens acerca da topografia da amostra, também fornece valores sobre as propriedades mecânicas das amostras avaliadas. A técnica de microscopia de força modulada (MFM) permite a aquisição do módulo de elasticidade, possibilitando assim a avaliação da elasticidade do tecido [39, 40, 41, 42, 43]. O MFM é uma técnica pertencente à família do MFA com alteração apenas de um dos componentes do equipamento. Os resultados obtidos com a técnica de MFM permitem comparar alterações nos valores do módulo de elasticidade, ou seja, valores ligados a propriedades mecânicas, em tecidos saudáveis e tecidos acometidos pela catarata em seus diversos graus. Contudo, propriedades mecânicas podem ser afetadas de modo ímpar pelo método empregado na preparação das amostras, por esta razão, o presente estudo se concentra na obtenção de informações morfológico-estruturais do cristalino.

Além do objeto de estudo cristalino, outro tecido pertencente ao sistema ocu-

lar, a córnea felina, também foi envolvido neste estudo. O tecido da córnea é a primeira estrutura da região anterior do sistema ocular, trata-se de um tecido fino, transparente, composto por camadas. A alta incidência da patologia associada à córnea felina: sequestro de córnea, foi considerada para a realização do estudo com este tecido, o que levou a realizar medidas topográficas com distintas técnicas, além de avaliar as mudanças ocorridas na córnea devido à incidência patológica [44]. O sequestro de córnea corresponde a uma doença ocorrente tipicamente em felinos e caracteriza-se pela descoloração em tons amarronzados ou negros levando à perda da acuidade visual sendo o tratamento, nos estágios mais avançados da doença, a intervenção cirúrgica [17].

Desta forma, o MFA apresenta-se como uma ferramenta em potencial para avaliação estrutural de tecidos biológicos e no auxílio ao diagnóstico de possíveis patologias relacionadas aos tecidos avaliados.

Capítulo 2

Objetivos

O objetivo geral desta pesquisa é investigar a viabilidade do MFA para tecidos oculares de forma mais célere e com maior resolução espacial e utilizá-la como meio de avaliação de tecidos, sejam eles sadios ou acometidos com alguma patologia além de desenvolver/aprimorar metodologias de preparação de amostras.

A avaliação estrutural dos tecidos oculares, na maioria das vezes, se trata de um fato que depende tempo e requer preparação do tecido concretizada em várias etapas minuciosas de uma série de procedimentos. Na análise histológica e microscopia eletrônica o tecido é preparado em diversas etapas para ser observado. Já a MFA permite a observação tanto de tecidos biológicos previamente preparados, como de tecidos biológicos somente fixados.

O MFA é essencialmente uma técnica de análise topográfica da amostra. Uma superfície idealmente plana produziria desta forma, imagens sem contrastes. O estudo de tecidos biológicos em geral através do MFA requer um processo de preparação das amostras que evidencie detalhes morfológico-estruturais dos tecidos em observação, desta forma, o processo de preparação e corte torna-se um fator importante. A investigação das respostas obtidas através de processos distintos de corte dos tecidos faz parte do escopo geral deste estudo.

O cristalino, como mencionado anteriormente, exhibe estruturas de fibras dispostas em camadas. A possibilidade de avaliar a organização e as dimensões estruturais no córtex e núcleo do cristalino com a MFA é, portanto o primeiro desafio. Os valores

assim determinados, e posteriormente confirmados pela análise histológica servirão como referência para o estudo com os tecidos acometidos pela catarata, permitindo-se traçar uma relação entre a disposição das fibras e as alterações nas propriedades ópticas dos cristalinos com distintos graus da patologia.

A pesquisa também se estendeu para o estudo da córnea, com as mesmas técnicas morfológicas. Neste caso, córneas felinas foram avaliadas através de técnicas histológicas e do MFA a fim de se estender o uso do equipamento de pesquisa para outros tipos de tecido, com estrutura completamente distinta do cristalino, e avaliar eventuais alterações no tecido devido à incidência de certas patologias.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Nesta seção estão descritos, de forma geral, os tecidos estudados neste trabalho, bem como as estruturas que os compõem e suas respectivas funções. As técnicas utilizadas e o funcionamento dos equipamentos também aqui são detalhados.

3.1 Cristalino: A lente natural do olho

O cristalino do olho corresponde a um tecido não usual, devido a ausência de suprimento sanguíneo ou nervoso além de não estar em contato celular com qualquer outro tecido [45]. Trata-se de um tecido com concentração altamente protéica, aproximadamente 33%. É opticamente denso, flexível e está localizado entre a superfície fixa primária refrativa da córnea. Possui duas principais propriedades ópticas - a transparência e o poder refrativo, essenciais para sua funcionalidade. Opticamente denso e maleável, o cristalino possui duas funções fundamentais: transmitir e focalizar a luz na retina [45].

O cristalino se localiza na região anterior do olho, suspenso atrás da íris radialmente pela zônula preso aos músculos ciliares. O corpo ciliar engloba a lente e é aproximadamente triangular em sua seção transversal, ele forma um anel separado aproximadamente concêntrico com o cristalino, sendo preso anteriormente pela esclera e posteriormente pela Ora Serrata [45]. A acomodação do cristalino, isto é, a deformação do tecido necessária de forma a mudar sua curvatura para focalização da luz na retina, procede pelo movimento do músculo ciliar, este se contrai fazendo com que o corpo se

torne inchado na direção radial [46], reduzindo o anel ciliar pelas zônulas e, desta forma, permitindo o melhor estado de acomodação para o cristalino [47, 48]. O relaxamento do músculo ciliar causa um achatamento da lente, próprio para a distância focal requerida [23, 49].

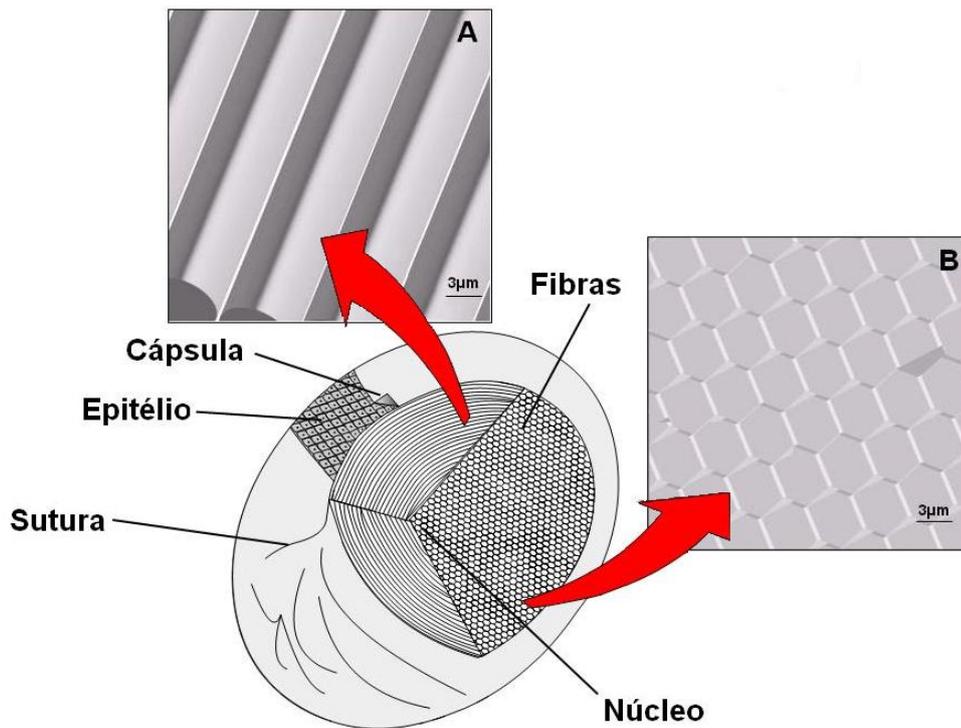


Figura 3.1: Esquema tridimensional do cristalino, indicando as estruturas inerentes ao tecido. As imagens ilustradas no esquema representam as imagens geradas através do MFA.

A macroestrutura do cristalino corresponde à cápsula, camada epitelial, córtex e núcleo, os dois últimos formados por células fibrosas [50]. A cápsula consiste em uma espessa membrana basal altamente elástica, secretada pelas células epiteliais da lente e engloba os elementos celulares do tecido [51]. No interior desta bolsa estrutural estão localizadas as fibras, as quais são chamadas assim, pois têm comprimento maior e não se constituem mais como células, elas correspondem a células epiteliais alongadas que perderam seus núcleos e outras organelas [52]. A camada epitelial localizada na região anterior do cristalino, ver figura 3.2, correspondem as verdadeira células do tecido, uma vez

que são as responsáveis pela produção de novas fibras do tecido de modo que continuam se dividindo ao longo da vida [53]. Já o núcleo do cristalino é constituído por fibras primárias, ou seja, fibras mais antigas produzidas pelo epitélio. As fibras novas quando produzidas alocam-se em camadas ao redor das primárias, como a estrutura de uma cebola, compondo o córtex [54].

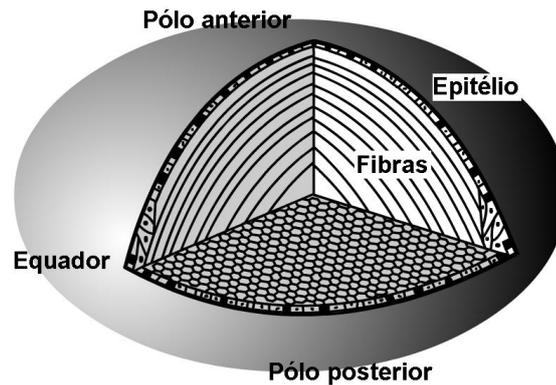


Figura 3.2: Esquema tridimensional do cristalino, indicando as regiões do tecido: pólo anterior, cuja posição é referida devido à presença da camada epitelial; pólo posterior, na qual cápsula e fibras estão em contato e equador.

Responsável por englobar o conteúdo do cristalino, a cápsula, consiste em uma membrana basal especializada que cerca o conteúdo do cristalino e serve de suporte para o anexamento das células epiteliais, ela também proporciona uma forma de ancoramento estável para as zônulas, corpos filamentosos que suspendem o cristalino e permite sua acomodação [55]. Um estudo com MFA revelou a estrutura laminar da cápsula, sendo cada lâmina correspondente a folhas de filamento de colágeno [56], principalmente do colágeno tipo IV. Este tipo de colágeno possui um importante papel na formação de uma rede molecular tridimensional e resiliente [57]. Do ponto de vista mecânico, a cápsula pode ser considerada uma rede de colágeno tridimensional embebida em uma matriz, sendo seu comportamento elástico não só determinado pelos componentes da estrutura, mas também pelos padrões geométrico e de deformação [58].

A cápsula continua a se desenvolver ao longo da vida, crescendo em espessura na região anterior e aumentando a área da superfície de forma a se ajustar ao crescente volume

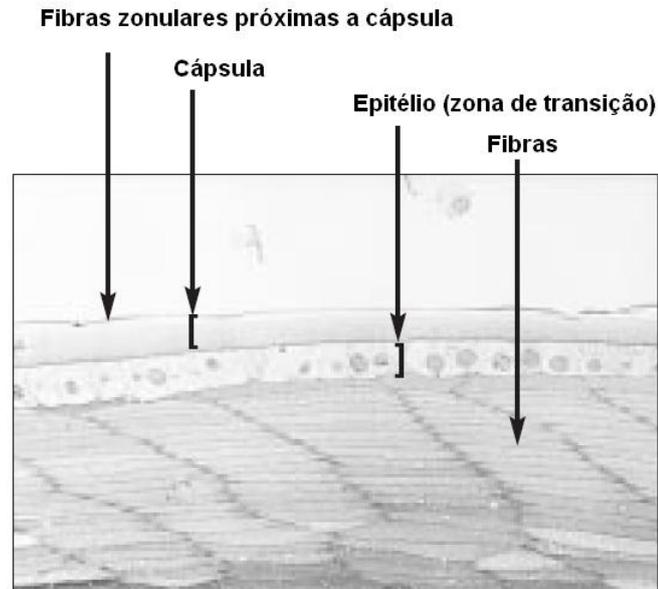


Figura 3.3: Microscopia de luz da lente humana. As principais estruturas são indicadas [45].

do conteúdo do cristalino. A cápsula anterior é produto do tecido epitelial, portanto refletindo a atividade das células epiteliais, as quais sofrem mudanças morfológicas com a idade [59]. Já o crescimento da cápsula posterior não é completamente entendido, algumas publicações sugerem que seu crescimento é cessado nos primeiros instantes após o nascimento [60].

O epitélio é uma monocamada de células que cobre a face anterior do cristalino, localizada entre as fibras e a cápsula. É dividida em epitélio central, composto por células que não se dividem; zona germinativa, representada pelas células que sofrem divisão e o epitélio equatorial, que representa as células em fase de diferenciação na forma de fibras [61], ver imagem 3.4. Durante a diferenciação, as células perdem seus núcleos e tornam-se mais alongadas [52]. Como mencionado anteriormente, o epitélio também dá origem à membrana basal da cápsula.

Além da síntese da membrana protéica e das fibras que compõem o cristalino, o epitélio tem função de transporte e secreção de substâncias através da cápsula [62]. As células do epitélio possuem interdigitações umas com as outras associadas a junções gap

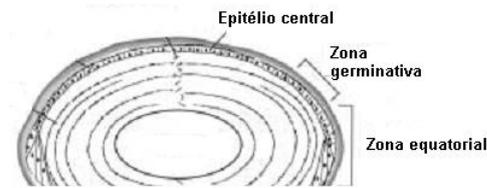


Figura 3.4: Esquema simplificado da região anterior do cristalino, nota-se as três regiões da camada epitelial: células quiescentes da zona central, células em divisão da zona germinativa e células em diferenciação da zona equatorial [61].

e desossomos, que não só permitem que as células sejam mantidas juntas, mas também a excelente comunicação entre elas [63, 64].

Estudos das taxas relativas de transporte de nutrientes entre as superfícies anterior e posterior do cristalino levaram ao modelo de bomba sódio/potássio/ATPase para o transporte de substâncias vide figura 3.5. Segundo este modelo, a dinâmica do transporte através do epitélio para o humor aquoso cria um gradiente de íons de Na^+ e K^+ no cristalino com altos níveis de K^+ na região anterior e altos níveis de Na^+ na região posterior. O epitélio trabalha então para manter a baixa concentração de sódio, bombeando K^+ e então extrudindo Na^+ [61], ver figura 3.5. Existe também uma bomba de cálcio/ATPase, responsável por manter o nível de Ca^{2+} baixo dentro do cristalino [45].

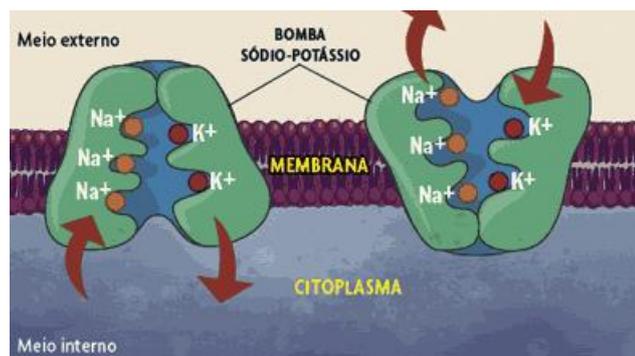


Figura 3.5: Esquema simplificado do funcionamento da bomba de sódio/potássio [65].

A grande massa do cristalino corresponde às fibras, compondo o córtex e o núcleo do tecido [66]. As fibras são geradas a partir das células do epitélio e diferenciadas na sua

região equatorial, onde se alongam e perdem a maior parte das organelas [45]. As fibras que compõem o núcleo do cristalino correspondem às primárias, do início do desenvolvimento embrionário, cercadas pelas fibras secundárias [66], que são aquelas diferenciadas na zona equatorial do epitélio.

Assim que as fibras secundárias são alongadas, suas extremidades anteriores são insinuadas entre o epitélio e o núcleo, enquanto que suas terminações posteriores, insinuadas entre a cápsula e a massa de fibras primárias (núcleo). O cristalino continua seu crescimento ao longo da vida, desta maneira, camadas de fibras secundárias são adicionadas àquela massa já existente de fibras de forma que a terminação anterior desta nova fibra insinua-se entre o epitélio e a camada anterior das fibras formadas, enquanto que sua terminação posterior se insinua entre a cápsula e a camada anterior das fibras [66].

A maturação das fibras secundárias é completa quando elas se destacam do epitélio e da cápsula, subseqüentemente juntando-se com outra nova camada de fibras maduras para formar as suturas do cristalino [52]. A sutura é a região do cristalino na qual as fibras se encontram, seu formato varia de acordo com a espécie. Suturas em forma de linha são presentes em anfíbios, já as suturas em forma de Y, ver figura 3.6, em coelhos, caninos, felinos, porcos, ovinos e bovinos. Em primatas, as suturas são de forma de estrela [67].

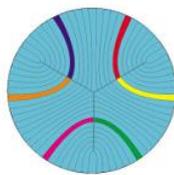


Figura 3.6: Esquema representativo da formação das fibras do cristalino e a sutura em forma de Y [67].

Fibras corticais são finas, bastante longas e hexagonais em corte transversal, sendo mais largas e grossas na região que cruzam o equador. Em camadas mais profundas do córtex, as membranas podem ser altamente entrelaçadas e as fibras bem finas, não

mostrando a natureza hexagonal das fibras claramente [45]. Junções gap também são encontradas entre as fibras, as quais permitem comunicação metabólica através do tecido, tais junções são diferentes daquelas encontradas na camada epitelial, são maiores e com menores conexões. A combinação de proteínas destas conexões existentes nas fibras são únicas ao cristalino [68].

Três tipos de superfície de junção das fibras foram observados através de MEV. O primeiro tipo corresponde ao de processo de engrenagem ao longo das seis arestas das fibras, que parecem aderir fibras adjacentes, um processo mais comum áreas mais profundas do córtex e núcleo e em áreas onde o cristalino muda sua forma para se acomodar. O segundo tipo de superfície de junção ocorre nas faces laterais das fibras chamada de junção bola-soquete, ocorre em maior parte no córtex da zona equatorial do cristalino, onde as forças zonulares são maiores [45]. O terceiro tipo de superfície de junção é o padrão do sulco-lingueta, observado por especialistas através do MEV, ver figura 3.7. Este padrão corresponde a pequenas estruturas enviesadas sobre as fibras. Não há uma explicação clara acerca da função destas estruturas, entretanto, especialistas da área acreditam que o padrão exista a fim de se evitar o deslizamento entre as camadas de fibras durante as mudanças lenticulares, este padrão é mais comum no córtex mais profundo e núcleo do cristalino [45].

Todas as células não musculares pertencente aos mamíferos possuem um citoesqueleto, a parte da celular que como o nome sugere, gera o suporte interno e estrutura para a célula. As fibras também possuem um citoesqueleto, formado por vários filamentos citoplasmáticos que constituem uma rede ancorada na membrana plasmática. O citoesqueleto e as membranas celulares das fibras interagem de certa forma com o cristalino, possivelmente para controlar sua distribuição (essencial para a transparência) e orientação [45].

Energia é requerida para todos os processos ativos essenciais para o crescimento e manutenção da transparência como na divisão celular, transporte de metabólitos e produtos de excreção. O cristalino por sua vez corresponde a um tecido menos ativo comparado com outros tecidos do organismo. A camada epitelial é a parte mais ativa metabolicamente da lente, enquanto o desenvolvimento superficial das fibras corresponde

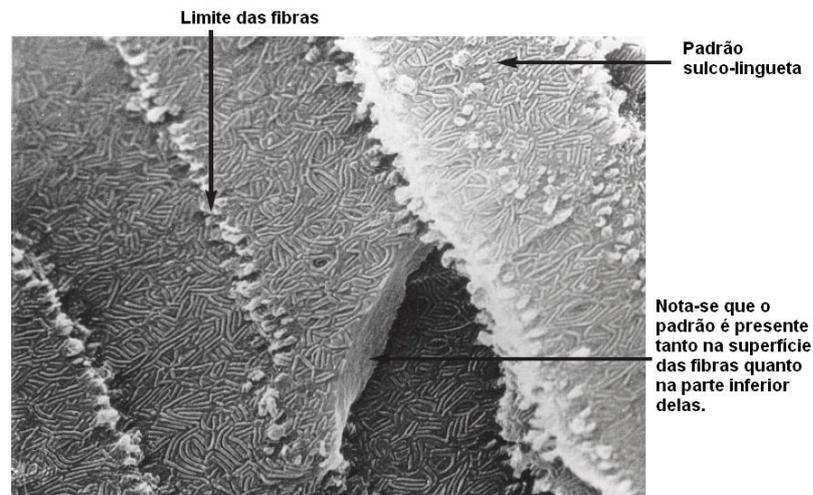


Figura 3.7: Padrão do sulco-lingueta observado através de microscopia eletrônica de varredura das fibras [45]. A figura apresenta um campo de aproximadamente $8\mu\text{m}$ de largura, já as fibras representadas na imagem correspondem àquelas constituintes do córtex profundo.

à parte menos ativa. As fibras mais profundas do córtex e núcleo são relativamente inativas [45]. As lentes estudadas neste trabalho correspondem a de mamíferos, e o caso particular de cães da raça poodle. Em tal raça a incidência da patologia associada ao tecido do cristalino é maior, sendo esta diagnosticada em diversos estágios da doença.

As lentes de cães possuem um volume de aproximadamente $0,5\text{ml}$, secção transversal de 7mm e secção longitudinal variando entre 9 e $11,5\text{mm}$ dependendo do tamanho do animal [9].

Transparência do cristalino

A transparência da lente é devido a sua homogeneidade óptica. A lente é essencialmente celular e as células geralmente não são transparentes a luz devido a absorção e espalhamento. A luz é espalhada pela maior parte dos constituintes de uma celular normal incluindo as paredes celulares, o citoesqueleto e as organelas dentro do citoplasma.

No cristalino, as fibras se arranjam em camadas, cada uma aproximadamente perpendicular à entrada de luz no olho, existindo apenas um pequeno espaço extracelular

para interromper a linha retilínea da luz, desta forma a luz é espalhada devido a membranas plasmáticas, apesar de a sua presença ser mínima. As fibras têm poucas organelas para espalhar ou absorver a luz e aquelas que permanecem imaturas nas fibras são confinadas nas regiões equatoriais, mascaradas pela íris. A luz também é pouco espalhada pelo citoplasma de uma fibra normal e suas proteínas solúveis [67].

Portanto a transparência ocorre devido à homogeneidade óptica das fibras da lente, da forma como elas estão ordenadas e da presença e posição das organelas. Outro fator da transparência está ligado a presença e distribuição uniforme das proteínas solúveis presentes no citoplasma [67]. O citoesqueleto tem um importante papel na manutenção da distribuição uniforme e no empacotamento das proteínas solúveis [69].

3.1.1 Catarata: Principal patologia associada à lente

A opacidade do cristalino, decorrente de qualquer causa, é em geral denominada catarata. O termo catarata vem da palavra grega *katarraktes* (queda da água, catarata) porque antigamente acreditava-se que a catarata era um fluido congelado do cérebro que fluíra para a parte frontal do cristalino [70]. A patologia pode ser diagnosticada em seus distintos graus. Nos estágios iniciais da doença, a presença de aglomerados de opacidade distribuídos pelo tecido podem ser observados [71], no entanto, apresentando ainda a possibilidade de visão. Já nos estágios mais avançados, a opacidade passa a dominar quase toda extensão do tecido, comprometendo a visão de modo irreversível.

As causas da doença são variadas, entre os principais fatores causadores estão: agregação de proteínas, disfunções metabólicas, algum tipo de estresse osmótico, efeito secundários de algumas doenças, fatores genéticos, lesões, exposição à radiação ou raios ultravioletas e toxinas [70].

O acúmulo de produtos resultantes de metabolismos alterados das fibras gera uma acidificação do tecido, fazendo com que as fibras se desidratem. Isso leva por consequência à solidificação das proteínas intracelulares e, desta forma, causando a opacidade permanente do cristalino [70].

Outro fator contribuinte para a formação de tipos de catarata está ligado desregularidade dos níveis de cálcio no tecido. Apesar da formação da calcificação ser um dos

causadores da patologia, seu processo ainda não é completamente entendido [72]. Trabalhos anteriores mostraram as alterações dos níveis de minerais em tecidos com e sem catarata [74]. Observou-se que os níveis de cálcio e sódio nos cristalinos com catarata apresentaram aumento significativo em relação aos cristalinos saudáveis, visto que a catarata está associada à alterações da bomba sódio/potássio das células epiteliais [61].

A patologia pode ser classificada em termos clínicos de acordo com a etiologia, idade, localização no tecido, formato e estágio de desenvolvimento. Etiologicamente, a catarata pode ser categorizada como hereditária ou adquirida, a última por motivos tais como traumas, agentes tóxicos, outras doenças oftalmológicas, medicamentos, radiação e fatores secundários de algumas doenças, tais como diabetes mellitus. Quanto à idade, pode ser denominada congênita, juvenil ou senil. As cataratas senis ocorrem geralmente na região nuclear do tecido [9, 70].

Classificada de acordo com a região da incidência patológica, ela pode ser cortical, cuja causa está, na maior parte dos casos, associada aos desequilíbrios eletrolítico e osmótico; ou nuclear, quando devido a modificações protéicas. Ou ainda, se classificadas quanto à região, sendo: capsular, sub-capsular, zonular, polar, axial ou equatorial. Ou a forma: radiada, cuneiforme, em fissura, em roseta, punctata, pulverulenta [9].

A classificação por estágio de desenvolvimento é a mais utilizada. Tal caracterização está associada ao reflexo tapetal bloqueado pela incidência da doença. A zona tapetal ou *tapetum lucidum* é uma região da retina localizada superiormente que aumenta a capacidade dos cães em detectar objetos na penumbra por possuir pigmentos reflexivos, o reflexo colorido observado nos olhos dos cães e gatos à noite ou em fotografias [9].

A catarata incipiente se caracteriza como estágio inicial da doença, a opacidade ocupa entre 10 a 15% do tecido, acometendo a região cortical e sub-capsular na maior parte das vezes e não comprometendo o reflexo tapetal. Na fase imatura, a opacidade é maior em relação à classificação anterior, e desta vez, já comprometendo parcialmente o reflexo tapetal. Quando matura, a catarata apresenta opacidade total, bloqueando totalmente o reflexo tapetal. A catarata hiper-matura caracteriza o último estágio, apresentando o aspecto brilhante e acomete as regiões do núcleo, córtex e cápsula. Neste último estágio, podem ocorrer centros de reabsorção, isto é, regiões do tecido que apresentam novamente

certa transparência [9, 70].



Figura 3.8: Casos de catarata canina em diferentes estágios de desenvolvimento da doença.

A progressão da catarata pode ocorrer de forma lenta ou célere, podendo estacionar. Não existe um tratamento específico para o controle de progressão da doença.

O tratamento para a catarata ocorre por meio de intervenção cirúrgica, apenas, na qual o tecido é removido. A cirurgia pode ser intracapsular ou extracapsular. Em 1746, J. Daviel realizou a primeira extração extra-capsular de catarata, removendo o conteúdo do cristalino através de uma incisão inferior. Em 1866, A. Von Graefe realizou a primeira remoção de catarata através de uma incisão superior com capsulotomia [70]. Em humanos, a extração intra-capsular era o método mais indicado, até meados dos anos 80. Hoje este tipo de extração é apenas usado para sub-luxação ou deslocamento do cristalino, neste método, o tecido inteiro é congelado em sua cápsula com uma crio-lâmina e o cristalino é removido do olho através de uma incisão superior na córnea [70]. Na extração extra-capsular, a cápsula anterior é aberta, então apenas o córtex e o núcleo do cristalino são removidos, a cápsula posterior e a zônula de suspensão permanecem intactas, o que prove uma base estável para a implantação da lente intra-ocular (LIO) na câmara posterior. Atualmente para cirurgia de catarata em humanos, a facoemulsificação (emulsificação e aspiração do núcleo do cristalino com agulha ultra-sônica de alta frequência) é a técnica mais indicada. Então o córtex e núcleo são removidos pela sucção com aspiração. A cápsula posterior é então polida e a lente LIO é implantada na cápsula vazia [70].

3.2 Outros tecidos oculares: Córnea

Investigações anteriores também designaram o uso do MFA para avaliações de outros tecidos oculares e suas patologias associadas. Neste caso, também foram investigadas, além do cristalino, as córneas felinas. Algumas investigações prévias realizadas com córnea, identificaram características estruturais peculiares aos tecidos saudáveis e enfermos, avaliando, desta forma, as alterações estruturais devido à incidência do sequestro. Esta patologia, como mencionado anteriormente, se caracteriza como uma alteração da coloração do tecido e trata-se de uma enfermidade comum aos felinos, entretanto sua causa não é totalmente conhecida [76].

A córnea se caracteriza por ser o tecido de interface entre o organismo e o meio externo e corresponde a um tecido transparente e límpido, composto por células organizadas e proteínas, tipicamente fibras de colágeno. Assim como o cristalino, a córnea não possui vasos sanguíneos, entretanto ela é nutrida pelas lágrimas e pelo humor aquoso, o qual preenche a câmara localizada atrás da córnea. Para o seu perfeito funcionamento, a córnea e suas camadas que a compõem devem estar livres de nuvens e regiões opacas, ela deve permanecer sempre transparente para transmitir a luz corretamente. O tecido da córnea felina é composto por cinco camadas: o epitélio, a membrana basal, o estroma corneal, a membrana de Descemet e o endotélio [76]. A imagem da figura 3.9 ilustra uma córnea saudável de felino.

O epitélio da córnea corresponde a camada mais externa, possui aproximadamente 10% da espessura da córnea e é provido com alta capacidade de regeneração. É constituído por mais quatro a seis camadas de células epiteliais escamosas estratificadas e não queratinizadas [76]. As células correspondentes às camadas mais profundas são do tipo colunares. Conforme estas células vão se reproduzindo através de atividade mitogênica, estas vão se tornando estratificadas e ocupando o espaço das células mais antigas, ou seja, mais superficiais, que por sua vez, passam a descamar.

A principal função do epitélio está ligada à proteção contra corpos estranhos, esta funciona como uma barreira que impede a saída de líquidos e a entrada de microorganismos. A região epitelial da córnea felina é constituída por células microvilosas, as

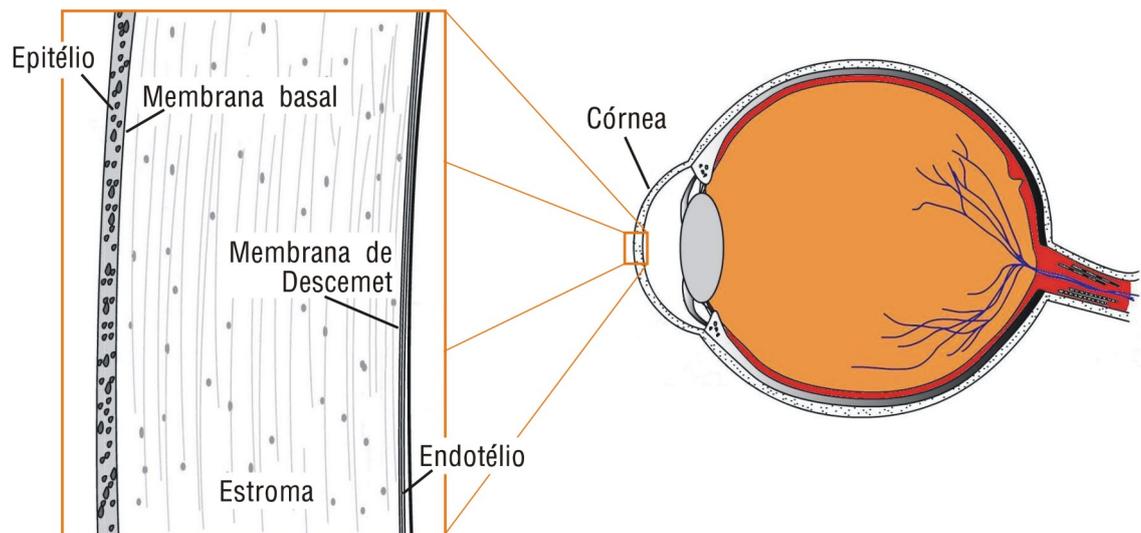


Figura 3.9: Diagrama representando uma secção transversal de uma córnea saudável felina e suas estruturas correspondentes.

quais possuem a função de manter a estabilidade, espalhar e garantir a aderência do filme lacrimal no plano ocular a fim de preservar a regularidade da superfície do sistema óptico [19]. As células epiteliais são altamente aderentes umas as outras e apresentam bordas bem definidas, são visíveis através de microscopia de alta resolução. As micro-projeções, isto é, partículas salientes com dimensão aproximada de $500nm$, elas têm a função de aumentar a estabilidade na interface entre o filme lacrimal e o próprio tecido epitelial a fim de garantir a estabilidade óptica, além de aumentar a área de superfície de contato facilitando a passagem intra e extracelular das moléculas (produtos de nutrição e excreção) através das membranas celulares [19].

A topografia da superfície com interface com o epitélio, ou seja, o estroma anterior, revela as propriedades fundamentais das células epiteliais, tais como a adesão, migração, proliferação e diferenciação.

A região estromal da córnea representa cerca de 90% do tecido corneano e é composta basicamente por fibras colágeno do tipo I. Os fibrócitos são células de forma ovóide ou irregular e na córnea aparecem em grupos de duas ou mais células entre as fibrilas de colágeno. Os fibroblastos são estruturas celulares constituintes do tecido conjuntivo e sua função consiste em produzir fibras estruturais, ou seja, sintetizam a matriz extracelular

do tecido conjuntivo. Quando amadurece se transforma em fibrócitos. São responsáveis pela produção de fibras colágeno tipo I, substância intracelular e origina células de outros tecidos conjuntivos e responsáveis pela regeneração [76].

A membrana de Descemet, terceira camada que constitui a córnea, é formada a partir do endotélio, ela reveste toda a superfície do estroma que é composta por uma camada anterior perto a ele e uma camada posterior próxima à última camada, o endotélio, o qual é formado por células hexagonais as quais formam o mosaico endotelial. Esta camada é fundamental para manter a transparência e organização das camadas da córnea evitando-se o edema corneano.

As alterações devido a instauração da patologia em específicas estruturas constituintes da córnea são descritas na próxima seção.

3.2.1 Sequestro de córnea

O sequestro de córnea corresponde à patologia ocorrente tipicamente em felinos. Caracteriza-se pela coloração amarronzada ou negra de regiões afetadas da córnea, na qual a necrose do estroma ocorre. A causa exata da doença ainda é desconhecida, entretanto o aparecimento do sequestro é geralmente associado a traumas corneanos, síndrome do olho seco e ou infecção pelo vírus do herpes felino [76]. A lesão gerada pela doença tem coloração escura e se mostra como uma placa oval ou disforme e frequentemente nasce acima da superfície da córnea [44].

A doença não está associada ao sexo e geralmente aparece em felinos adultos, entretanto sua presença em algumas raças é mais frequente que em outras. Gatos da raça persa, siamês e himalaia apresentam mais incidência da doença em comparação com gatos de outras raças [77, 78]. A genética destas raças pode não ser o principal fator da incidência do sequestro, porém muitos fatores compartilhados por estas raças podem levar a predisposição ao sequestro [77].

Em alguns casos a doença apresenta uma opacidade confinada no estroma, não mostrando sinais de desconforto. Entretanto, o sequestro geralmente progride e se torna mais denso, adquirindo bordas e iniciando o processo de extrusão, gerando a perda do epitélio. Especialistas classificam o sequestro de córnea de acordo com a coloração e

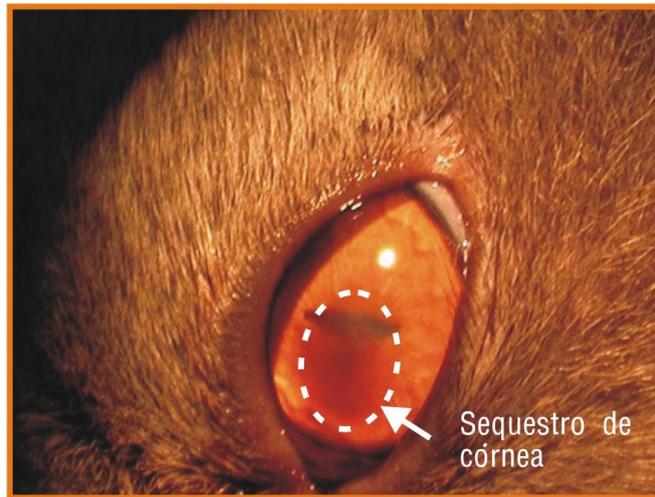


Figura 3.10: Felino com a córnea acometida pela patologia no estágio inicial, tipo II.

progressão da doença. O sequestro tipo I é dado como o mais escuro e sobressalente, necessitando frequentemente de intervenção cirúrgica; enquanto que o sequestro tipo II é caracterizado como uma lesão mais clara, no tom âmbar, coberta por um epitélio intacto, porém degenerado.

O tratamento do sequestro em gato geralmente é através de cirurgias. Alguns casos podem ser tratados com antibióticos e lubrificantes oculares, já os casos com extrusão têm a chance de serem cirurgicamente removidos, encurtando o curso da doença. O sequestro superficial pode ser tratado com queratectomia superficial, a córnea felina possui aproximadamente $0,6mm$ de espessura e alguns cirurgiões recomendam que a dissecação na córnea seja aprofundada em até $0,3mm$ dentro do risco. Pós-cirurgicamente, alguns sequestros podem requerer o uso de antibióticos e lubrificantes oculares para uma cura satisfatória. Sequestros mais profundos requerem uma dissecação mais agressiva, podendo necessitar de um transplante de conjuntiva [76].

3.3 Análise histológica

A histologia (do grego, *hydton*, tecido e *logo*, estudo) trata-se do estudo dos tecidos, sua estrutura e condição e teve início com desenvolvimento dos microscópios

ópticos (MO) e de técnicas para preparo de material biológico, tornando-o adequado para exame [20]. Para se tornar possível a avaliação das estruturas através da MO, as amostras devem ser preparadas. Esta preparação deve ser realizada em etapas, passando por fixação, inclusão em parafina e, por fim, a coloração.

Fixação com Formol e Coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E)

A forma mais comum de avaliação através do MO consiste na fixação com Formol, inclusão em parafina e coloração com H&E. Outras técnicas são utilizadas para demonstrar estruturas específicas de das células e componentes de tecidos.

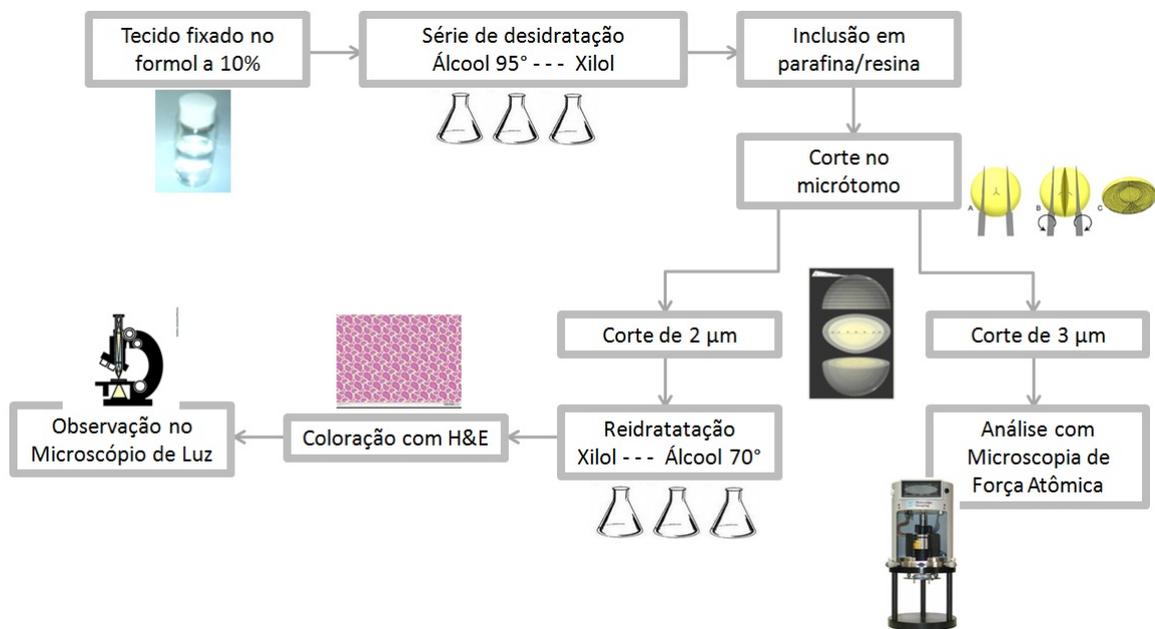


Figura 3.11: Esquema da preparação de tecidos para observação com MO ou MFA.

A fixação é necessária para cessar o metabolismo da célula e preservar, desta forma, a estrutura do tecido para os tratamentos subsequentes, introduzindo apenas um pequeno número de artefatos, isto é, estruturas artificiais produzidas durante a fixação que podem parecer traços reais da histologia [20]. O formol, a 10% em solução aquosa de formaldeído, em várias diluições e combinações com outras soluções tampão, é o fixador mais utilizado. O formaldeído conserva a estrutura geral da célula e os componentes extra-celulares através da reação com os amino-grupos das proteínas. Esta solução não

reage com lipídios, sendo, portanto, não recomendado para conservação de membranas [21].

Após a fixação, as amostras a serem observadas por MO devem ser infiltradas em um meio de inclusão de forma a permitir que sejam cortadas através do micrótomo com espessuras de 2 a 10 μ m, e então lavadas com água para iniciar a desidratação, que é necessária, já que os meios mais comuns de inclusão (ex. parafina, monômeros plásticos) são imiscíveis em água [20].

A inclusão é necessária a fim de manter a amostra dura o necessário para realizar os cortes no micrótomo antes da coloração. A desidratação da amostra ocorre por meio de imersão em uma série de soluções de álcool com concentrações crescente até 100% de álcool para remover a água. Solventes orgânicos como Xilol ou Toluol, que são miscíveis tanto em água quanto em parafina, são usados para remover então o álcool antes da infiltração da amostra em parafina derretida [21].

Após a inclusão, a amostra, agora dentro do bloco de parafina, é submetida aos cortes com o micrótomo, para a confecção das lâminas. A parafina é mais utilizada pois é mais fácil de trabalhar, acelera a preparação do tecido e é corada com facilidade; entretanto a parafina possui baixa tensão de ruptura e portanto não pode ser cortada em fatias muito finas. Para observação no MO, as secções devem possuir de 2 a 10 μ m de espessura, [20].

Para prosseguir para a última etapa de coloração das lâminas, a parafina da amostra deve ser dissolvida novamente e Xilol ou Toluol e reidratada em série de soluções decrescentes de concentração de álcool. A amostra das lâminas são então coradas com hematoxilina em água, devido a eosina ser mais solúvel em álcool que em água, a amostra é novamente desidratada em uma série de soluções crescentes em concentração de álcool e corada com eosina em álcool. Após a coloração, a amostra é transferida do meio de Xilol ou Toluol para meio não-aquoso e coberta com uma lamínula para obter a preparação permanente [20]. Segue na tabela 3.1 um sumário das reações dos principais componentes de células e tecidos às colorações.

Apesar do processo de coloração H&E ser o mais utilizado, ele não é adequado para revelar algumas estruturas tais como materiais elásticos, membranas basais e lipídios.

Para observação de tais componentes, são utilizados processo de coloração tais como o uso de orceína, prata e resorcina-fucsina para materiais elásticos [21]. O processo utilizado para a observação através do MO é descrito com mais detalhes na seção de preparação das amostras.

<i>Componente celular e extracelular</i>	<i>Reação à coloração</i>
<i>Nucléolo</i>	<i>Azul</i>
<i>Citoplasma geral</i>	<i>Rosa</i>
<i>Filamentos do citoplasma</i>	<i>Rosa</i>
<i>Fibrilas de colágeno</i>	<i>Rosa</i>
<i>Material elástico¹</i>	<i>Rosa, geralmente não distinguível das fibrilas de colágeno</i>
<i>Meio da matriz extracelular</i>	<i>Azul, visível apenas se em grande quantidade</i>
<i>Membrana basa²</i>	<i>Rosa</i>

Tabela 3.1: Sumário do resultado da coloração com H&E.

Outros fixadores

Apesar do formol ser o fixador mais utilizado, ele não preserva todos os componentes celulares, não elucidando as composições químicas destes componentes. Outro fator seria a perda de muitos componentes na preparação da amostra, para reter estas estruturas, outro método de fixação pode ser utilizado. O uso de álcool e solventes naturais removem os lipídios neutros, para retê-los são usadas secções de tecido fixado em formol e corantes que se dissolvem em gordura. Já para reter estruturas das membranas, fixadores a base de metais pesados que se ligam ao fosfolipídeos devem ser usados [21].

O Boiun é um fixador muito utilizado em estudos embrionários e para fixação de peles. Tem em sua composição formaldeído e ácido pícrico, o que fornece a coloração amarelada a solução. Trata-se de um fixador para utilização em períodos curtos de tempo, aproximadamente 24 horas, se o tecido for deixado por tempo demasiado, este se torna quebradiço.

¹Necessário processo de coloração como resorcina-fucsina ou orceína.

²Necessário processo de impregnação em prata.



Figura 3.12: Fixadores utilizados na conservação dos tecidos para observação com microscopia de força atômica.

3.4 Microscópio de Força Atômica (MFA)

O microscópio de força atômica (MFA) foi desenvolvido em 1986 por Binnig, Quate e Gerber e pertence à categoria dos microscópios de varredura por sonda (MVS), os quais se utilizam de uma ponta para gerar a imagem da amostra, sem o uso de lentes. O primeiro microscópio desenvolvido foi o microscópio de tunelamento (MVT), o qual gera imagens de amostras condutoras ou semicondutoras com resolução atômica [79]. Já o MFA permite a obtenção de informações topográficas em resolução atômica e possibilita a geração de imagens de amostras não condutoras, inclusive de amostras biológicas.

A parte essencial do MFA, e para a todos os microscópios de sonda, é a ponta, a qual determina através de sua estrutura o tipo de interação com a superfície e pela sua geometria, a área de interação. A idéia original do MFA era medir a interação de van der Waals do átomo mais extremo da ponta com os átomos da superfície de análise [79].

Uma descrição elementar da técnica e discussão detalhada dos aspectos peculiares envolvidos diretamente nas análises realizadas nesta dissertação são apresentados a seguir.

O equipamento, como mencionado brevemente, possui uma ponta fina e sensível que percorre a amostra, a imagem topográfica é gerada através desta ponta a qual é presa a um cantiléver. Um feixe de laser é colocado sobre o cantiléver e um fotodetector é posicionado, a fim de se medir a deflexão do laser conforme a ponta percorre uma superfície. Esta deflexão é captada pela variação da posição do laser no fotodetector, tal

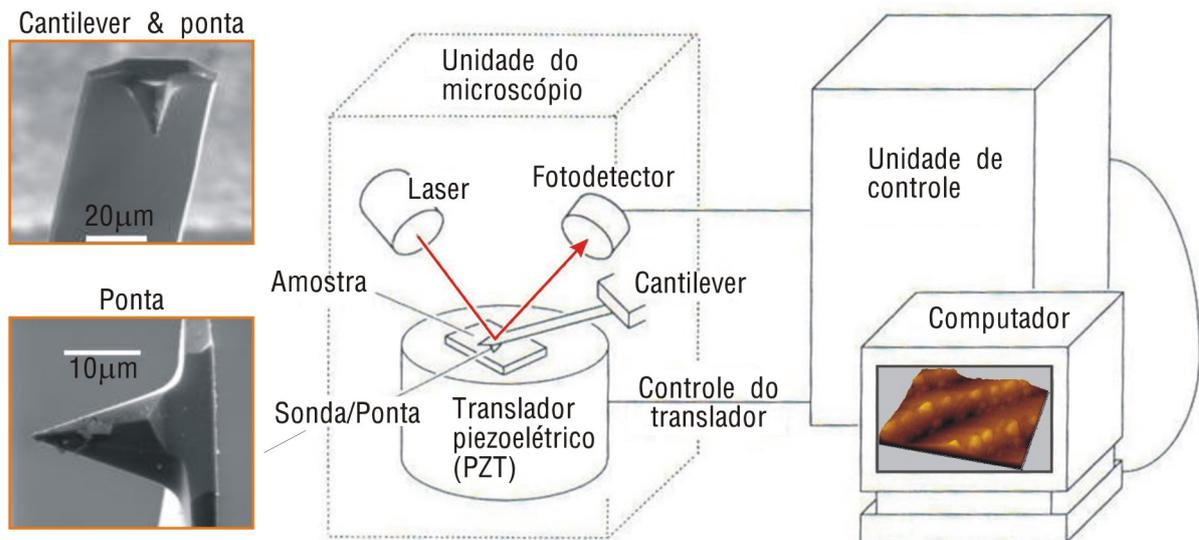


Figura 3.13: Estrutura básica do MFA: unidade do microscópio (estágio para amostra, *scanner* piezoelétrico, laser, ponta, cantiléver e fotodetector), unidade de controle e computador.

informação é transmitida para o computador, um sistema de realimentação que corrige continuamente as distâncias entre ponta e amostra. Esta correção dos valores em Z da altura em função da varredura em X e Y ponto a ponto é armazenada no computador, gerando a imagem [35].

O *scanner* é o mecanismo responsável pelo movimento de varredura da ponta, tanto em X e Y, como na correção em Z, ele é formado por um material piezoelétrico que possui a propriedade de se contrair ou expandir de acordo com a voltagem aplicada, sendo a contração quando aplicado voltagem positiva e expansão quando voltagem negativa. Esta contração ou expansão faz com que a ponta se mova para uma posição mais distante ou próxima da superfície da amostra, respectivamente [79].

A varredura XYZ feita pelo *scanner* é realizada ponto a ponto, sendo a varredura rápida na direção horizontal e a lenta, na vertical, de acordo com o esquema da figura 3.15. Após cada varredura rápida, ou horizontal, ocorre um pequeno deslocamento para a linha seguinte, caracterizando a varredura lenta, ou vertical. Este resultado gera uma imagem com um determinado número de pontos, um parâmetro ajustado pelo usuário,

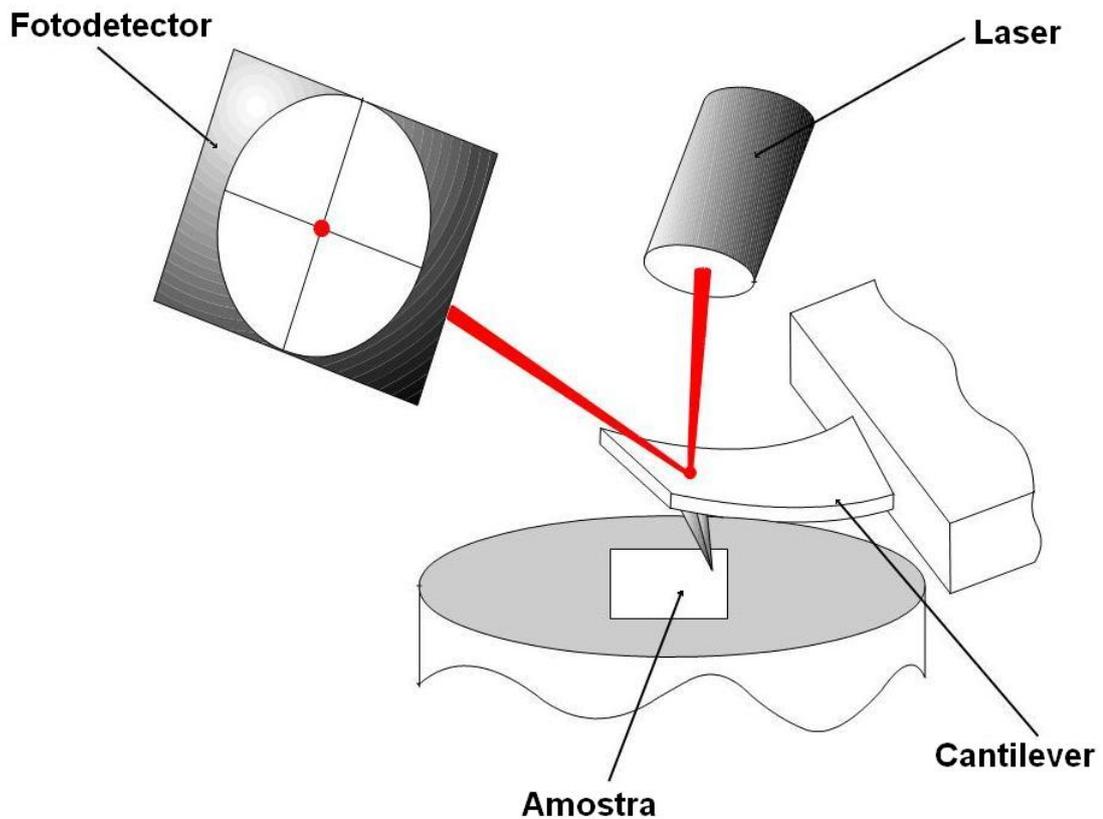


Figura 3.14: Esquema do microscópio sob o ponto de vista do processo de obtenção da imagem.

o qual pode ser de 128x128, 256x256 ou 512x512 pontos, sendo o último, o de maior resolução. O espaço correspondente à distância entre cada ponto é o tamanho de pixel, medido pela razão da amplitude de varredura pelo número de pontos em uma linha.

O material piezolétrico que forma o *scanner* é o titanato de zircônio chumbo ou PZT. Esse material é prensado obtendo um sólido policristalino cerâmico. Cada cristal possui um momento de dipolo elétrico próprio. Para que o material se comporte como um piezolétrico, todos os cristais devem estar com os dipolos alinhados, isso é obtido aquecendo-se o *scanner* a 200°C, o que libera a movimentação dos dipolos, depois é aplicada uma voltagem DC por algumas horas. Após o procedimento, o *scanner* é resfriado.

O alinhamento dos dipolos do *scanner* é mantido seu uso frequente, quando aplicada voltagem na direção do alinhamento. Se o uso do *scanner* não é contínuo, os dipolos passam a se orientar de forma aleatória, tal fato é acelerado se o *scanner* for

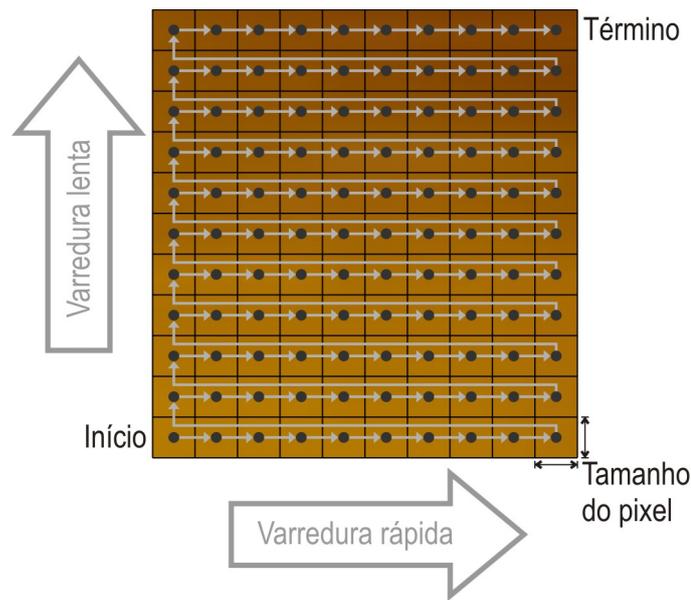


Figura 3.15: Esquema de varredura do *scanner*. Os pontos correspondem às regiões de varredura, na qual, pontos na linha horizontal correspondem à varredura rápida. A varredura lenta é relacionada a direção vertical.

submetido a temperaturas superiores a 150°C.

O material piezelétrico se comporta, de forma ideal, de acordo com a relação:

$$s = d \cdot E \quad (3.1)$$

onde s é a contração relativa em $\text{Å}/m$, E é campo elétrico em V/m e d é uma constante característica do material em $\text{Å}/V$. Porém, na prática, o comportamento do *scanner* não é ideal, gerando alguns problemas inerentes a ele, tais como: *histerese*, *creep*, não linearidade intrínseca, *aging*, *cross coupling*; sendo que os 3 últimos podem ser evitados se calibrando o equipamento corretamente com uma amostra padrão. Alternativamente, todos os problemas relacionados acima podem ser corrigidos através de *hardware* específico que monitore o real deslocamento das cerâmicas piezelétricas.

O fotodetector é dispositivo responsável pelo monitoramento da deflexão do laser. Como esquematizado na figura 3.17, ele é composto por quatro quadrantes, A, B, C e D, que detectam valores independentes de intensidade luminosa I_A , I_B , I_C e I_D . A

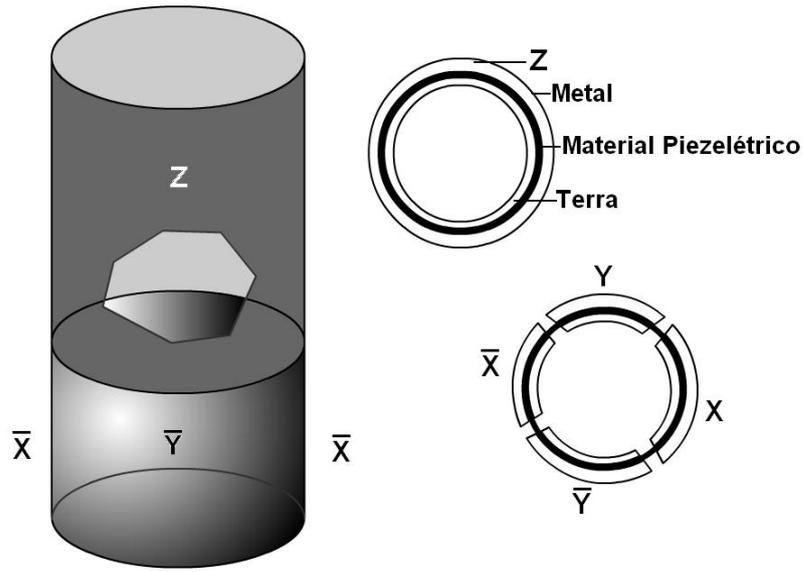


Figura 3.16: Esquema de contração e expansão do *scanner* de acordo com a aplicação da voltagem. O material piezoeletrico se deforma.

deflexão lateral do laser é determinada pelo valor da diferença:

$$\Delta I_{lat} = (I_A + I_C) - (I_B + I_D), \quad (3.2)$$

enquanto que a deflexão vertical é dada pela diferença:

$$\Delta I_{vert} = (I_A + I_B) - (I_C + I_D), \quad (3.3)$$

Na posição de deflexão zero, isto é, quando o laser está posicionado no centro do fotodetector, obtém-se $\Delta I_{lat} \cong \Delta I_{vert} \cong 0$ ao mesmo tempo que $I_A + I_B + I_C + I_D \neq 0$, indicando que o laser está atingindo o fotodetector.

3.4.1 Modos de operação

O MFA pode obter imagens de três formas distintas: o modo contato, no qual a ponta percorre a amostra encostando-se a ela, com a força agente da ordem de 10^{-6}N ou 10^{-7}N ; o modo não contato, no qual a ponta não se encosta à amostra, com a força de da ordem de 10^{-12}N e modo de contato intermitente, no qual a ponta oscilante percorre a amostra encostando-se levemente a ela, tendo este modo, a força de variando entre 10^{-12}N e 10^{-6}N .

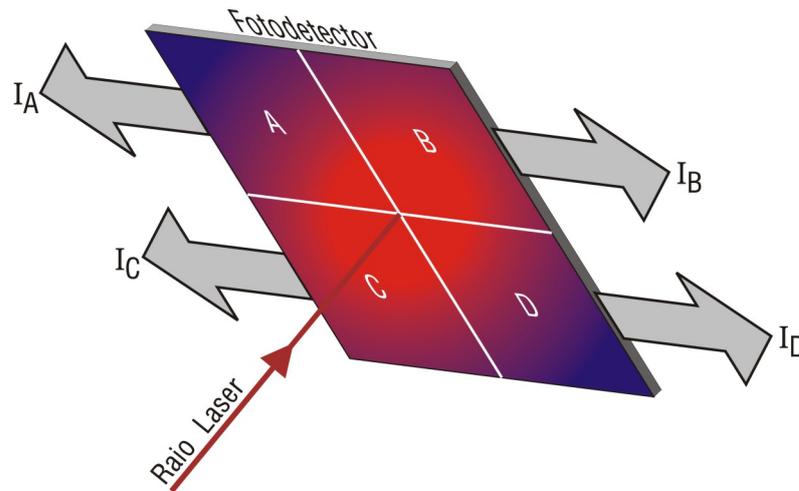


Figura 3.17: Esquema dos quadrantes do fotodetector. O laser deve ser alinhado no centro dos quatro quadrantes.

Independente do modo de operação escolhido, tem-se sempre o mesmo tipo de força exercida, a qual corresponde à força de interação entre ponta e amostra, chamada de força de van der Waals. O gráfico da figura 3.18 representa o tipo da força inerente a cada modo de operação, mostrando a variação da força de van der Waals em termos da distância entre ponta e amostra, ele mostra que a força agindo no modo contato é repulsiva, enquanto que no modo não contato ela é atrativa, sendo a ponta mantida a centenas de angstroms distante da superfície da amostra [79].

O modo contato é caracterizado por realizar a varredura da superfície da amostra encostando-se a ela, sendo dessa forma aplicada uma força maior que a aplicadas aos outros modos. A força de van der Waals exercida é positiva, resultando numa força repulsiva, indicada por uma curva com coeficiente angular alto, como observado no gráfico anterior, a ponto de se observar, ao aproximar a ponta da amostra, uma deformação do cantiléver. Para a obtenção de imagens através do modo contato é necessário um cantiléver com constante elástica menor do que a constante elástica do material do qual a amostra é composta, justamente pelo fato do cantiléver deformar-se e não a amostra.

A formação da imagem de uma amostra com alturas variadas ocorre devido à deflexão do cantiléver. Existem duas opções de medida para o modo contato, a primeira se dá mantendo-se constante o valor da altura e medindo-se a deflexão. A segunda cor-

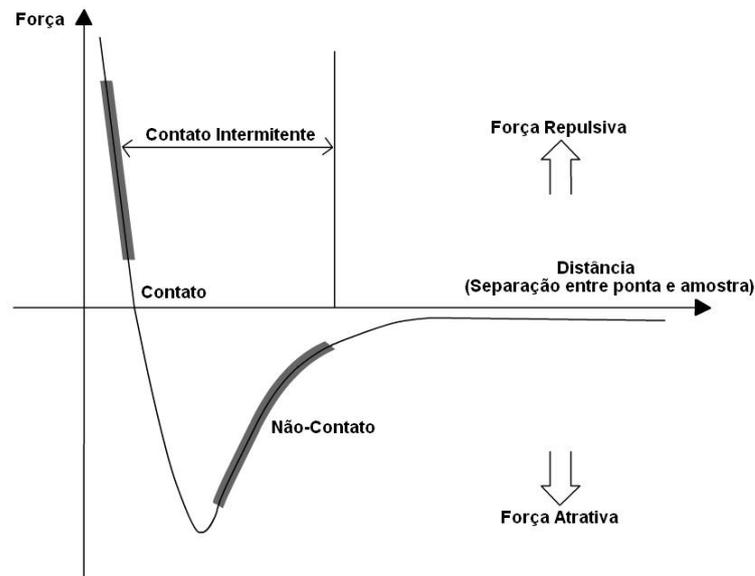


Figura 3.18: Força versus distâncias (entre ponta e amostra). A força de van der Waals é alterada acordo com o modo de operação do equipamento. Os modos contato intermitente e contato associam-se às forças repulsivas, enquanto que o modo não contato está relacionado à força atrativa.

responde a manter a deflexão constante obtendo os valores de altura [79]. No primeiro método, a altura constante é mantida através de uma varredura paralela à superfície da amostra, sem a realização de correções na altura. Este modo é mais indicado para amostras, na qual, durante a obtenção da imagem, deseja-se obter resolução atômica, tendo a vantagem das imagens serem formadas com mais celeridade. Na segunda forma de geração de imagem, o sistema de *feedback* mantém a deflexão do cantiléver constante durante a varredura da amostra, variando-se a altura, armazenando os valores ponto a ponto X e Y mais a posição vertical do cantiléver. Tal método tem a vantagem de manter a deflexão constante e, portanto a força bem controlada, evitando quaisquer danos que possam ser causados à amostra, porém a correção de altura em cada ponto é mais demorada, gerando a imagem mais lentamente.

No modo de contato intermitente, ou AC Mode, o cantiléver oscila próximo à sua frequência de ressonância, no qual a ponta encosta-se à superfície da amostra levemente a cada ciclo de sua oscilação. É necessário saber o valor da frequência de ressonância

do cantiléver utilizado. O equipamento permite esta medida que é feita vibrando-se o cantiléver livremente através do transdutor, assim gerando um gráfico que indica a resposta do cantiléver na sua frequência de ressonância. Deve-se escolher uma frequência menor do que a indicada pelo equipamento, já que esta diminui da ordem de 0,2kHz no momento em que a ponta começa a tocar a amostra no início da medida.

O modo contato intermitente trabalha apenas com o rms (*root mean square*) ou média quadrática da amplitude de oscilação constante no momento de varredura da amostra. O rms de amplitude é mantido constante, e conseqüentemente a distância média entre ponta e amostra também. Os valores X e Y da varredura ponto a ponto são armazenados juntamente com as correções de altura Z. A varredura completa indica a topografia da superfície da amostra. O parâmetro de *setpoint* no modo contato intermitente indica a amplitude que deve ser mantida constante. Para valores próximos a 2, a interação entre a ponta e amostra será fraca, já que a oscilação da ponta é quase livre, isso permite varreduras menos agressivas, gerando menos danos a ponta e a amostra, porém com a correção de altura Z em cada ponto mais lentamente. Para valores próximos a 1, a interação entre a ponta e amostra é mais forte, permitindo a obtenção de imagens mais rapidamente.

Comparado aos outros modos de operação, o modo de contato intermitente tem a vantagem de apresentar força lateral menor que no modo contato, causando dano menor a amostra, além de possuir resolução lateral superior a do modo não contato. Tem como desvantagem um tempo de obtenção da imagem de varredura completa superior, se comparado ao modo contato.

Modo intermitente com controle magnético

Uma variação do modo de operação de contato intermitente também é utilizado, este possui as mesmas características do modo de contato intermitente, porém com um maior controle durante a medição devido ao sistema de controle da oscilação do cantiléver. O MAC Mode, ou Magnetic AC Mode, corresponde a um método de oscilação do cantiléver, cujo o controle é realizado por um campo magnético. Como no outro modo intermitente, o cantiléver neste caso também é controlado para altas frequências e a su-

perfície é monitorada por mudanças na amplitude. A diferença entre o MAC Mode e as outras técnicas de contato intermitente é a possibilidade de se controlar o cantiléver através de um campos magnético. Dessa forma, a necessidade de se controlar o mecanismo de montagem do cantiléver pode ser eliminada. O uso deste método para se dirigir a ponta resulta em um aumento expressivo do controle.

As pontas utilizadas para este método são propriamente cobertas com uma fina camada de material magnético possibilitando, desta forma, o controle através de um campo magnético [80].

O controle, a ausência de ruído de *background* e a relação sinal-ruído aperfeiçoada, permitem amplitudes reduzidas e, portanto forças verticais menos intensas na amostra, o que preserva o rigor da ponta e contribui para o grande aumento da resolução. As forças de contato de baixa intensidade permitem a geração de imagens de amostra sensíveis.

O sistema MAC Mode foi inicialmente desenvolvido utilizando-se uma partícula magnética anexada a um cantiléver do MFA a fim de se aplicar a força no cantiléver valendo-se de um campo gerado por um solenóide [80]. Um arranjo sensível [81] é obtido colocando-se o campo magnético B perpendicular ao momento M no cantiléver, resultando no torque $N = M \times B$, ou a força no fim do cantiléver de magnitude N/L , onde L é o comprimento do cantiléver [82].

3.4.2 Propriedades Mecânicas através da Microscopia de Força Modulada (MFM)

Uma posterior etapa de avaliação do tecido corresponde a obtenção do seu mapeamento elástico. A MFM é utilizada para se detectar propriedades mecânicas como diferenças de valores de elasticidade e rigidez. Nesta modalidade, a ponta varre a amostra em contato com a superfície e aplica, durante a varredura, uma força oscilante de intensidade constante, o que gera uma pequena indentação na superfície da amostra. O suporte da ponte ou *tip holder* deste tipo de modo é diferenciado, possibilitando a aplicação de uma força oscilante mantendo o contato com a superfície da amostra. Para superfícies de

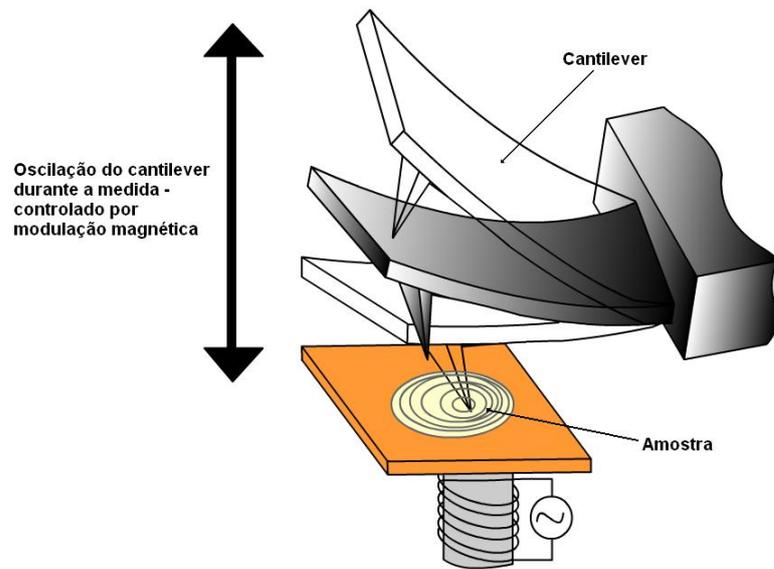


Figura 3.19: Esquema de oscilação do sistema MACMode, controle por modulação magnética.

maior elasticidade, a ponta irá penetrar mais e assim a deflexão do cantiléver será menor, enquanto que se a superfície for mais dura, a ponta irá penetrar menos, gerando assim, uma deflexão maior do cantiléver. A deflexão do cantiléver é inversamente proporcional à deformação da superfície.

A elasticidade ao longo da superfície da amostra é dada através da obtenção da amplitude de deflexão do cantiléver. Esta amplitude é armazenada na coordenada Z juntamente com a posição X e Y. Observa-se que as regiões mais claras mostram a superfície de maior elasticidade [39].

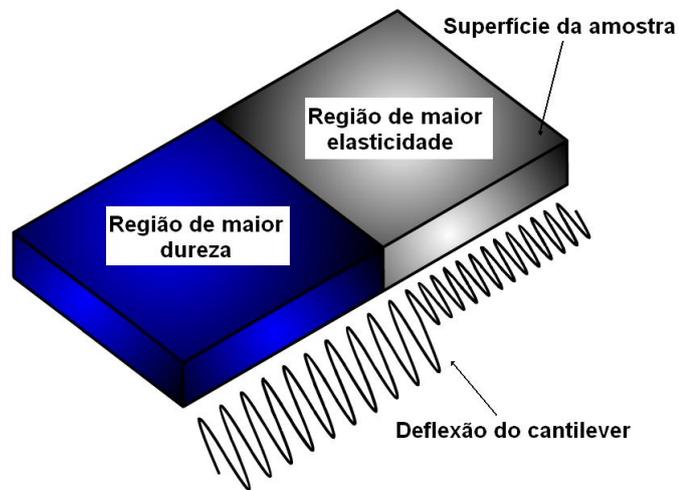


Figura 3.20: Esquematização da geração do sinal por MFM, no qual a deflexão maior do cantilever representa regiões de maior dureza e a deflexão menor do cantilever, a área de maior elasticidade.

Capítulo 4

Parte experimental

Nesta pesquisa foram utilizados cristalinos de coelho sadios e cães da raça poodle acometidos com catarata. Os cristalinos de coelho foram utilizados para medidas preliminares, com as quais foi possível avaliar a técnica de MFA como instrumento de medida e análise de material biológico, bem como obter medidas preliminares de dimensões estruturais e periodicidade. Já os cristalinos de cachorro foram utilizados para a avaliação do próprio tecido e suas estruturas e dos graus de catarata através desta técnica.

Os cristalinos dos mamíferos em geral têm a constituição estrutural muito parecida, mudando apenas a quantidade de camadas de fibras que compõem o tecido, sendo este fator o determinante para o tamanho do próprio cristalino [66]. Os cristalinos foram submetidos à três diferentes preparações para as análises topográficas. As preparações são descritas a seguir.

Córneas felinas acometidas com sequestro foram utilizadas a fim de se analisar alterações estruturais no tecido devido a ação da patologia, em uma segunda etapa do trabalho.

4.1 Preparação dos tecidos oculares para análise histológica

Os tecidos oculares, cristalino e córnea, foram preparados para análise histológica através de dois métodos distintos: Inclusão em parafina e inclusão em resina. A seguir são descritas as duas preparações histológicas distintas e os tecidos submetidos a cada preparação.

4.1.1 Preparação histológica através da inclusão em parafina

Os cristalinos de cachorro com distintos graus de catarata (imatura, madura e hipermatura) e córneas felinas com sequestro foram submetidas a este tipo de inclusão. As lâminas e lamínulas resultantes foram utilizadas para a observação no microscópio óptico e também ao MFA.

Os tecidos preparados através desta técnica foram previamente fixados em formol 10%. Em seguida, foram submetidos a uma série de desidratações, seguindo do álcool 95% até o xilol. Após a última troca, os tecidos foram finalmente incluídos em parafina e deixados para endurecer por uma noite. Após a etapa de inclusão, os blocos de parafina contendo o tecido foram submetidos ao corte com o micrótomo, ambos os tecidos oculares utilizados (cristalinos e córneas) foram cortados com espessura de $2\mu\text{m}$ e os cortes finais acondicionados em lâminas. Foram realizados cortes com o micrótomo com espessura de $3\mu\text{m}$ e estes acondicionados em lamínulas. Este último foi utilizado para a técnica de MFA e portanto não necessitaram da etapa seguinte de coloração, descrita a seguir.

Os cortes nas lâminas então foram corados com eosina e hematoxilina. Para a realização da coloração, as lâminas contendo os cortes foram submetidas a uma bateria, iniciando com o xilol até o álcool 70%. Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina e em seguida com a eosina. Estas seguiram então para uma avaliação através do MO. As imagens histológicas finais foram obtidas através da observação das lâminas no MO acoplado a uma câmera digital CCD (*Charge Coupled Device*).

4.1.2 Preparação histológica através da inclusão em resina

Apenas as córneas felinas com sequestro foram submetidas a este tipo de inclusão. Foram obtidos cortes nas lâminas e lamínulas para a observação através da microscopia óptica e da técnica de MFA.

Para a realização da inclusão em resina, as córneas foram submetidas a uma bateria de desidratação, partindo do álcool 95% até a solução de álcool e resina (solução 1:1) e então a inclusão propriamente dita em resina por uma noite para endurecer. O bloco contendo o tecido incluído na resina é então fixado em um molde e levado ao micró-tomo para o corte. Foram realizados cortes de $2\mu\text{m}$ de espessura e estes acondicionados em lâminas. Os cortes com $3\mu\text{m}$ de espessura foram colocados em lamínulas, para a observação com o MFA, estes não necessitaram da coloração.

Os cortes contidos nas lâminas foram corados com eosina e hematoxilina e em seguida levados para a observação através do MO. As imagens histológicas da córnea foram obtidas da mesma forma que na inclusão em parafina.

Uma amostra de cada tipo de catarata de cães da raça poodle foi analisada através da técnica histológica, estas foram incluídas em parafina, como descrito anteriormente. Para a córnea felina, três amostras foram utilizadas, duas com inclusão em resina e a outra incluída em parafina. Mais a seguir estão descritas as amostras, os animais, bem como a técnica utilizada para a análise.

4.2 Preparação dos tecidos oculares para análise topográfica com o MFA

Os cristalinos observados pela técnica de MFA foram preparados através de duas maneiras distintas. A primeira correspondeu a própria preparação histológica, com os cristalinos de cachorro incluídos em parafina, com os cortes acondicionados em lamínulas e sem coloração, como descrito na seção anterior. A segunda preparação correspondeu àquela realizada para análise através do MFA. Para esta, os cristalinos, tanto de coelho quanto os de cachorro, foram submetidos a simples fixação com o formol 10% com a final-

idade de conservar suas características o mais próximo possível da condição de atividade.

Após a fixação, os tecidos foram cortados em sua secção transversal em fatias de aproximadamente $3mm$ de espessura. Os tecidos, depois de fixados e cortados, foram deixados para secar, sendo utilizados para a observação através da técnica de MFA.

4.3 Equipamento

O equipamento utilizado para a obtenção das imagens de cristalino foi o *Pico SPM I* da *Molecular Imaging* (Tempe, AZ, USA), figura 4.1, as medidas foram realizadas no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O sistema utilizado para as medidas foi o modo de contato intermitente MACMode e o modo de contato intermitente, em ambas as medidas foram utilizados cantilévers MACLevers type II. Em todas as medidas o *scanner* grande foi empregado, com range XY de $80\mu m$ e range Z de $7mm$. As imagens foram obtidas com o cantiléver oscilando em 60% de sua frequência de ressonância, em média e com velocidade de varredura de 0,3 linhas por segundo e imagens com resolução de 256 por 256 linhas.

O MFA permitiu a obtenção de imagens com alta resolução, bem como o tratamento das imagens através do *software* do próprio equipamento, o que permitiu a determinação das características estruturais.

A primeira observação através do MFA foi utilizando cristalinos sadios de coelhos, estes foram observados sem prévia preparação, apenas com a fixação do tecido. As imagens foram geradas com o uso do modo MACMode, de oscilação magnética. Medidas preliminares foram adquiridas com esta avaliação prévia, na qual foi possível obter os valores para as dimensões das fibras estruturais do tecido bem como a periodicidade delas.

Uma segunda leva de medidas com o MFA foi realizada utilizando cristalinos de cachorro com catarata em distintos graus. As amostras utilizadas tinham sido submetidas apenas a fixação em formol 10%. Imagens de catarata canina imatura foram obtidas através do modo de contato intermitente AC (controle por meio de campo elétrico). As imagens de catarata matura e hiper-matura foram geradas com o modo MACMode (controle



Figura 4.1: Equipamento PicoScan SPM I, utilizado para avaliações e obtenção das imagens de alta resolução.

por modulação magnética), o mesmo utilizado para a obtenção de imagens dos cristalinos de coelho, na primeira observação.

O terceiro grupo de amostras correspondeu àquele cuja preparação fora a mesma realizada para a análise através das técnicas histológicas, ou seja, os tecidos foram incluídos em parafina, cortados, porém com espessura maior, de $3\mu\text{m}$, e sem coloração.

As medidas de córneas felinas através do MFA foram realizadas em uma quarta fase, as imagens foram obtidas com o modo MACMode, e as amostras observadas foram preparadas como descrito na seção anterior. Duas das amostras analisadas pela técnica histológica também foram observadas por MFA, uma incluída em parafina e outra em resina.

4.4 Resumo das preparações

As tabelas 4.1 a 4.5 resumem as informações das amostras analisadas tanto por MO quanto por MFA. Nela constam informações dos animais e indicações de qual amostra foi analisada por cada técnica em particular, além das condições dos tecidos para o estudo. A primeira coluna de cada tabela indica o número da figura mostrada na seção

de Resultados.

<i>Figura</i>	<i>Amostra</i>	<i>Espécie/ Raça</i>	<i>Preparação</i>	<i>Espes- sura</i>	<i>Região do tecido</i>	<i>Corte</i>	<i>Técnica</i>
5.1	cs1	Coelho/ Himalaia	Fixação em for- mol a 10%	3mm	Córtex	Longitudinal	MFA - MACMode
5.2	cs2	Coelho/ Himalaia	Fixação em for- mol a 10%	3mm	Córtex	Transversal	MFA - MACMode
5.3	cci1	Cachorro/ Poodle	Fixação em for- mol a 10%	3mm	Córtex	Longitudinal	MFA - AC- Mode
5.4	cci1	Cachorro/ Poodle	Fixação em for- mol a 10%	3mm	Córtex	Longitudinal	MFA - AC- Mode

Tabela 4.1: Descrição das amostras de **crystalino sadios** (cs) e com **catarata imatura** (cci) utilizados para identificação e caracterização das estruturas do tecido, indicando o animal e raça, condições do tecido e técnicas utilizadas para a análise.

<i>Figura</i>	<i>Amostra</i>	<i>Espécie/ Raça</i>	<i>Preparação</i>	<i>Espes- sura</i>	<i>Região do tecido</i>	<i>Corte</i>	<i>Técnica</i>
5.5	cci2	Cachorro/ Desc.	Inclusão em para- fina corado com H&E	2 μ m	Córtex perifé- rico	Longitudinal	MO - His- tologia
5.6	cci2	Cachorro/ Desc.	Inclusão em para- fina corado com H&E	2 μ m	Córtex perifé- rico	Longitudinal	MO - His- tologia
5.7	cci2	Cachorro/ Desc.	Inclusão em para- fina	3 μ m	Córtex perifé- rico	Longitudinal	MFA - MACMode
5.8	cci3	Cachorro/ Poodle Toy	Fixação em for- mol a 10%	3mm	Córtex	Longitudinal	MFA - MACMode
5.9	cci3	Cachorro/ Poodle Toy	Fixação em for- mol a 10%	3mm	Córtex	Longitudinal	MFA - MACMode

Tabela 4.2: Descrição das amostras de cristalino acometidos com **catarata imatura** (cci) utilizados para caracterização dos tecidos, indicando o animal e raça, condições do tecido e técnicas utilizadas para a análise.

<i>Figura</i>	<i>Amostra</i>	<i>Espécie/ Raça</i>	<i>Preparação</i>	<i>Espes- sura</i>	<i>Região do tecido</i>	<i>Corte</i>	<i>Técnica</i>
5.10	<i>ccm1</i>	<i>Cachorro/ Desc.</i>	<i>Inclusão em para- fina corado com H&E</i>	<i>2μm</i>	<i>Córtex perifé- rico</i>	<i>Longitudinal</i>	<i>MO - His- tologia</i>
5.11	<i>ccm1</i>	<i>Cachorro/ Desc.</i>	<i>Inclusão em para- fina</i>	<i>3μm</i>	<i>Córtex/ núcleo</i>	<i>Longitudinal</i>	<i>MFA - MACMode</i>
5.12	<i>ccm1</i>	<i>Cachorro/ Desc.</i>	<i>Inclusão em para- fina</i>	<i>3μm</i>	<i>Córtex perifé- rico</i>	<i>Longitudinal</i>	<i>MFA - MACMode</i>
5.13	<i>ccm2</i>	<i>Cachorro/ Poodle Toy</i>	<i>Fixação em for- mol a 10%</i>	<i>3mm</i>	<i>Córtex</i>	<i>Longitudinal</i>	<i>MFA - MACMode</i>
5.14	<i>ccm2</i>	<i>Cachorro/ Poodle Toy</i>	<i>Fixação em for- mol a 10%</i>	<i>3mm</i>	<i>Córtex</i>	<i>Longitudinal</i>	<i>MFA - MACMode</i>

Tabela 4.3: Descrição das amostras de cristalino acometidos com **catarata matura** (ccm) utilizados para caracterização dos tecidos, indicando o animal e raça, condições do tecido e técnicas utilizadas para a análise.

<i>Figura</i>	<i>Amostra</i>	<i>Espécie/ Raça</i>	<i>Preparação</i>	<i>Espes- sura</i>	<i>Região do tecido</i>	<i>Corte</i>	<i>Técnica</i>
5.15	<i>cch1</i>	<i>Cachorro</i>	<i>Desc. Inclusão em para- fina corado com H&E</i>	<i>2μm</i>	<i>Córtex perifé- rico</i>	<i>Longitudinal</i>	<i>MO - His- tologia</i>
5.16	<i>cch1</i>	<i>Cachorro</i>	<i>Desc. Inclusão em para- fina corado com H&E</i>	<i>2μm</i>	<i>Córtex perifé- rico</i>	<i>Longitudinal</i>	<i>MO - His- tologia</i>
5.17	<i>cch1</i>	<i>Cachorro</i>	<i>Desc. Inclusão em para- fina</i>	<i>3μm</i>	<i>Córtex perifé- rico</i>	<i>Longitudinal</i>	<i>MFA - MACMode</i>
5.18	<i>cch1</i>	<i>Cachorro</i>	<i>Desc. Inclusão em para- fina</i>	<i>3μm</i>	<i>Córtex perifé- rico</i>	<i>Longitudinal</i>	<i>MFA - MACMode</i>
5.19	<i>cch2</i>	<i>Cachorro/ Poodle</i>	<i>Fixação em for- mol a 10%</i>	<i>3mm</i>	<i>Córtex</i>	<i>Longitudinal</i>	<i>MFA - MACMode</i>
5.20	<i>cch2</i>	<i>Cachorro/ Poodle</i>	<i>Fixação em for- mol a 10%</i>	<i>3mm</i>	<i>Córtex</i>	<i>Longitudinal</i>	<i>MFA - MACMode</i>
5.21	<i>cch3</i>	<i>Cachorro/ Poodle</i>	<i>Fixação em for- mol a 10%</i>	<i>3mm</i>	<i>Córtex</i>	<i>Longitudinal</i>	<i>MFA - MACMode</i>
5.22	<i>cch3</i>	<i>Cachorro/ Poodle</i>	<i>Fixação em for- mol a 10%</i>	<i>3mm</i>	<i>Córtex</i>	<i>Longitudinal</i>	<i>MFA - MACMode</i>

Tabela 4.4: Descrição das amostras de cristalino acometidos com **catarata hipermatura** (cch) utilizados para caracterização dos tecidos, indicando o animal e raça, condições do tecido e técnicas utilizadas para a análise.

<i>Figura</i>	<i>Amostra</i>	<i>Espécie</i>	<i>Preparação</i>	<i>Espes-sura</i>	<i>Região do tecido</i>	<i>Técnica</i>
5.23	sqc1	Gato	Inclusão em resina corado com H&E	2 μ m	Estroma	MO - Histologia
5.24	sqc1	Gato	Inclusão em resina corado com H&E	2 μ m	Estroma/epitélio	MO - Histologia
5.25	sqc2	Gato	Inclusão em parafina corado com H&E	2 μ m	Estroma/epitélio	MO - Histologia
5.26	sqc2	Gato	Inclusão em parafina corado com H&E	2 μ m	Estroma/epitélio	MO - Histologia
5.27	sqc2	Gato	Inclusão em parafina	3 μ m	Epitélio	MFA - MACMode
5.28	sqc2	Gato	Inclusão em parafina	3 μ m	Epitélio	MFA - MACMode
5.29	sqc3	Gato	Inclusão em resina corado com H&E	2 μ m	Estroma	MO - Histologia
5.30	sqc3	Gato	Inclusão em resina corado com H&E	2 μ m	Estroma	MO - Histologia
5.31	sqc3	Gato	Inclusão em resina	3 μ m	Estroma	MFA - MACMode
5.32	sqc3	Gato	Inclusão em resina	3 μ m	Estroma	MFA - MACMode
5.33	sqc3	Gato	Inclusão em resina	3 μ m	Estroma	MFA - MACMode

Tabela 4.5: Descrição das amostras de córnea acometidos com **sequestro** (sqc) utilizados para caracterização dos tecidos, indicando o animal e raça, condições do tecido e técnicas utilizadas para a análise.

Capítulo 5

Resultados

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos através do MFA e da histologia dos cristalinos hígidos, assim como dos cristalinos acometidos com distintos graus de catarata. As características intrínsecas de cada um desses níveis distinto da doença são também comentadas. Resultados de outros tecidos oculares analisados, como a córnea em seu estado sadio e acometido com a patologia associada: o sequestro de córnea, constam nesta parte de análise. Imagens de córnea obtidas através do MFA e histologia como técnica comparativa são ilustradas nesta seção.

5.1 Avaliação estrutural do cristalino por Histologia e MFA

5.1.1 Estruturas básicas do cristalino

As figuras 5.1 a 5.4 mostram as imagens obtidas através do MFA de tecidos sadios, e de regiões sadias dos tecidos acometidos por catarata imatura. As amostras relacionadas a estas imagens foram apenas fixadas em formol 10% e observadas em sua forma seca. A macroestrutura da amostra de tecido sadio pode ser claramente observada num corte longitudinal. A figura 5.1 mostra a imagem do tecido exposto num corte longitudinal na qual a periodicidade das fibras e sua disposição em camadas concêntricas são visíveis. A medida da periodicidade a partir desta imagem fornece um valor de $4\mu\text{m}$ para a região

cortical, o que está de acordo com a literatura [66], [45], na qual as fibras de um cristalino sadio de um mamífero possuem, em média, o diâmetro de 2 a $5\mu\text{m}$ na região cortical, de acordo com o observado com o MFA. A imagem da figura 5.2 representa as fibras do cristalino em um corte transversal, na qual, é possível a visualização da secção das estruturas, representadas como células hexagonais. Nestas imagens, o dimensionamento também foi possível com a utilização do *software*, sendo $(3,9 \pm 0,7)\mu\text{m}$ e $(1,78 \pm 0,14)\mu\text{m}$, no diâmetro menor.

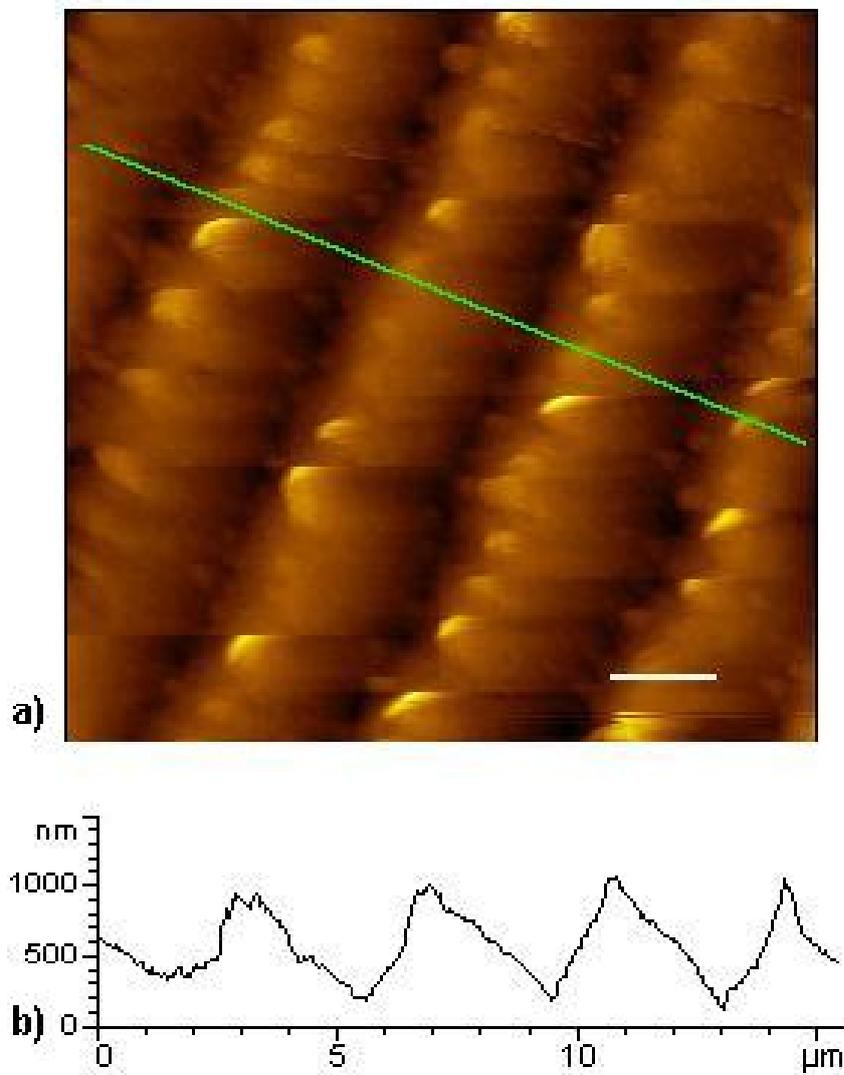


Figura 5.1: a) Imagem de MFA obtidas através do MACMode de um cristalino de coelho sadio na região cortical, mostrando as fibras no corte longitudinal, vide figura 3.1. b) Detalhe do relevo mostrando a variação da altura Z ao longo da linha indicada em a). A periodicidade observada da ordem de $4\mu\text{m}$ está relacionada ao diâmetro das fibras. Barra de escala= $2\mu\text{m}$.

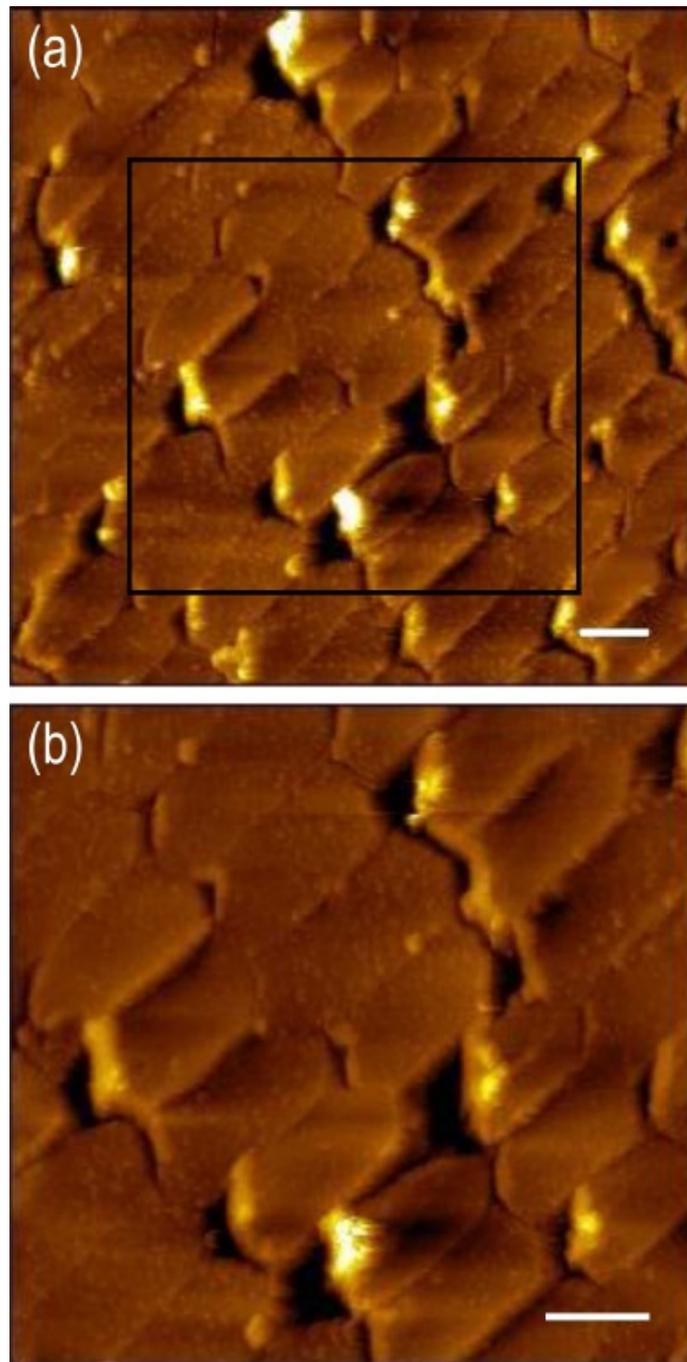


Figura 5.2: a) Imagem de MFA obtidas através do MACMode de um cristalino de coelho sadio. A imagem ilustra as fibras no corte transversal, os valores de diâmetro foram obtidos, correspondendo em média a $5\mu\text{m}$, na região cortical da amostra, barra de escala= $3\mu\text{m}$. b) Área demarcada em a) em maior aumento, barra de escala= $2\mu\text{m}$

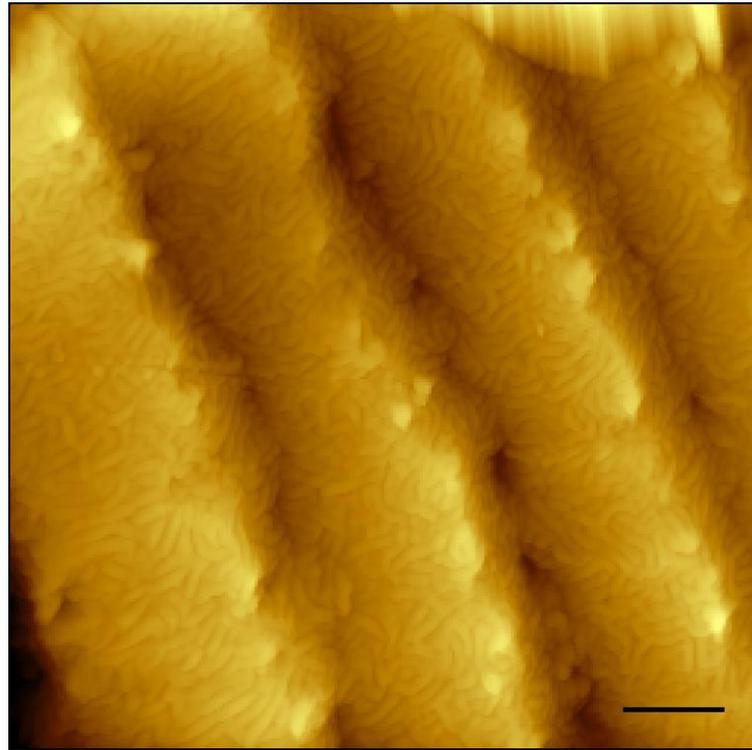


Figura 5.3: Imagem de MFA obtida através do modo de contato intermitente AC na região sadia da amostra *cci1*. A imagem ilustra as fibras no corte longitudinal da região do córtex. O processo de corte expôs as fibras sem dano às fibras, sendo possível visualizar o padrão sulco-lingueta. Barra de escala= $2\mu\text{m}$.

O corte longitudinal objetiva seccionar o tecido paralelamente ao comprimento das fibras. As imagens 5.3 e 5.4 são da região cortical do tecido não acometido pela catarata, mostrando as fibras com diâmetros da ordem de $4\mu\text{m}$. A interface entre as fibras, exposta pelo corte, apresenta um relevo peculiar do tecido caracterizado pelo padrão sulco-lingueta. Tal padrão fora identificado na literatura através da microscopia eletrônica de varredura, ver figura 3.7. A função do padrão observado ainda não é totalmente clara, entretanto, especialistas acreditam que se sua existência se deve a evitar o deslizamento entre as fibras durante mudanças em sua forma lenticular [45]. As imagens das figuras 5.3 e 5.4 correspondem à amostra *cci1*, vide tabela 4.1.

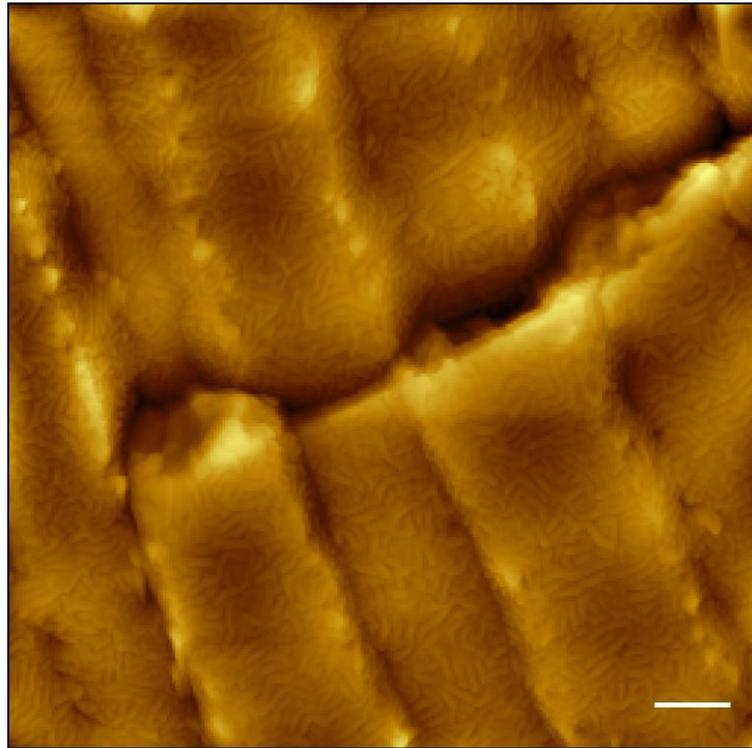


Figura 5.4: Região sadia de um cristalino com catarata imatura adquirida através de MFA no modo contato intermitente AC da amostra *cci1*. A imagem ilustra as fibras no corte longitudinal da região do córtex. O processo de corte expôs as fibras, rompendo uma das camadas de fibras permitindo a visualização de interface entre as camadas, sendo possível visualizar o padrão sulco-lingueta. Barra de escala= $2\mu\text{m}$.

5.1.2 Catarata Imatura

A análise da catarata imatura oferece a vantagem de uma mesma amostra apresentar tanto regiões acometidas pela doença, como regiões não afetadas. Acrescentam-se aos resultados de MFA já apresentados, as imagens obtidas das regiões afetadas pela patologia. Além das imagens provenientes de outras amostras com e sem prévia preparação.

Amostras com preparação (desidratação, infiltração e corte)

A primeira análise realizada com o tecido acometido com a catarata correspondeu ao cristalino com catarata imatura, na qual a amostra um nível ameno de degradação com áreas opacificadas isoladas no tecido. As imagens obtidas com MO das regiões saudáveis e acometidas pela doença são mostradas nas figuras 5.5 e 5.6, respectivamente. As fibras podem ser perfeitamente identificadas, com aproximadamente $5\mu\text{m}$ de diâmetro. Na imagem da figura 5.6, são observáveis vacúolos de aproximadamente $1\mu\text{m}$ de diâmetro distribuídos por toda a imagem.

Na imagem da figura 5.7 são observáveis, além das fibras do tecido, depressões circulares de diâmetros da ordem de $1\mu\text{m}$, indicados pelas setas. As imagens das figuras 5.6 e 5.7, foram obtidas a partir da amostra, porém de uma região diferente do tecido já apresentando alterações devido à instauração da patologia. Nota-se na imagem histológica que apesar da presença de pontos que correspondem a regiões menos espessas entre as fibras, estas ainda se apresentaram organizadas. As estruturas circulares apresentaram diâmetros entre 2 a $5\mu\text{m}$, visualizadas tanto na imagem histológica quanto nas imagens de MFA, entretanto, neste segundo caso, as estruturas circulares aparecem como pontos mais escuros, visíveis na figura 5.7.

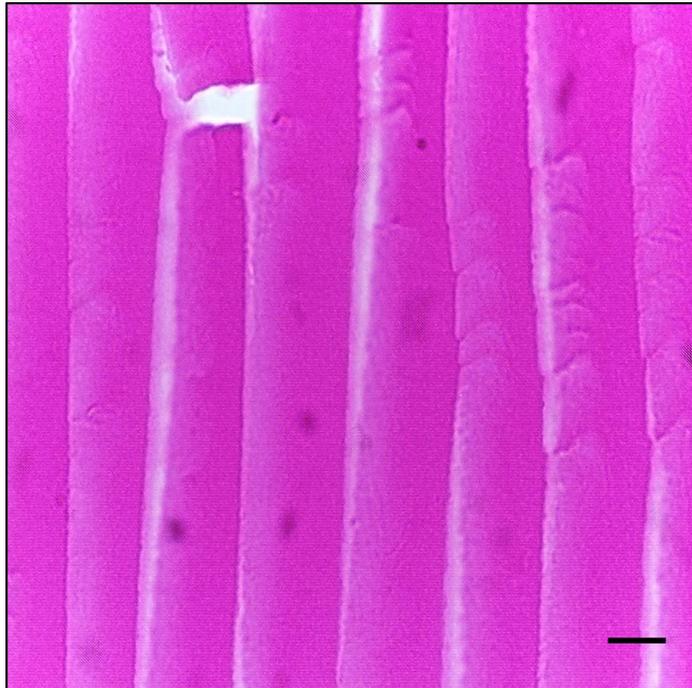


Figura 5.5: Imagem histológica de uma região sadia de cristalino acometido com catarata imatura, em corte longitudinal, amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Barra de escala= $5\mu\text{m}$.

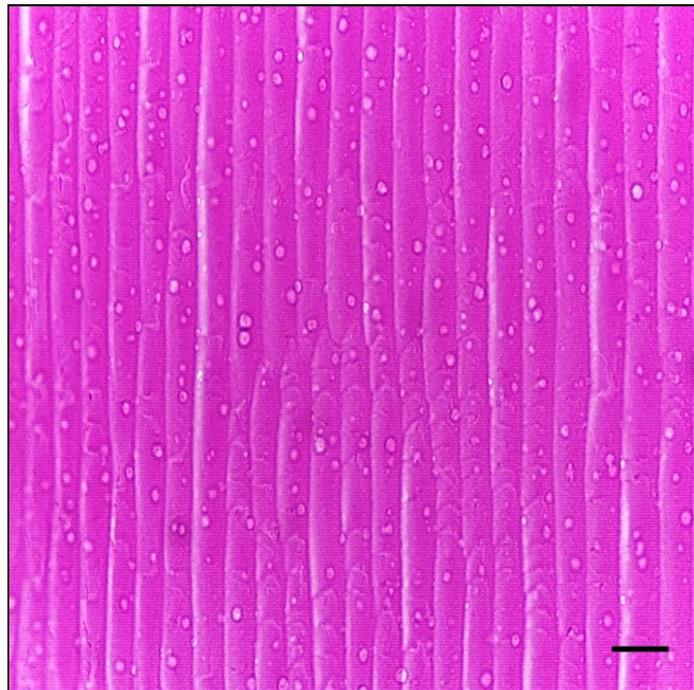


Figura 5.6: Catarata imatura, amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Nota-se a presença de estruturas circulares na imagem. Barra de escala= $10\mu\text{m}$.

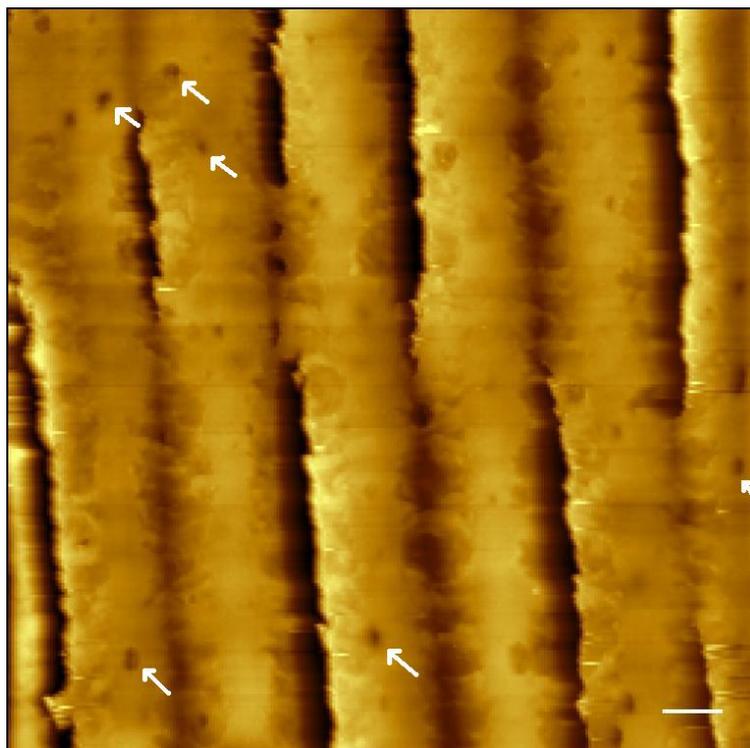


Figura 5.7: Imagem de MFA da catarata imatura, amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $3\mu\text{m}$, sem coloração. As flechas indicam buracos na estrutura fibrosa, provavelmente relativos às estruturas circulares esbranquiçadas observadas na imagem histológica. Barra de escala= $5\mu\text{m}$.

Amostras sem preparação - fixação em formol 10%

A seguir são apresentadas as imagens obtidas através do MFA sem preparo prévio, apenas com a fixação do tecido. O grupo de imagens de catarata imatura por MFA sem preparo corresponde às imagens da amostra *cci3*, vide tabela 4.2. As imagens das figuras 5.8 e 5.9 foram obtidas através do modo MACMode, em ambas, não se observa qualquer presença regularidade estrutural. Nota-se apenas estruturas circulares de diâmetros entre 1 e $2\mu\text{m}$.

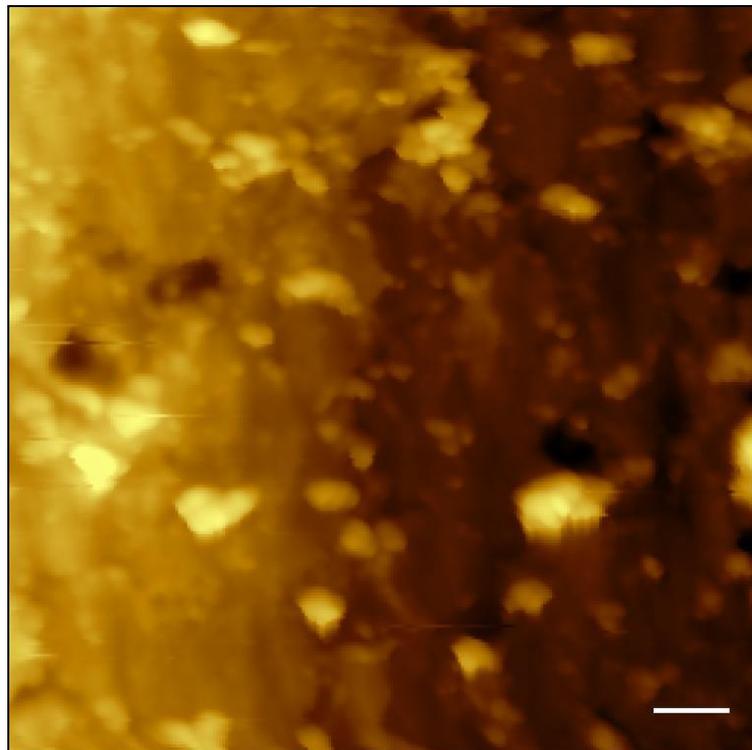


Figura 5.8: Imagem de MFA de catarata imatura obtida através do MACMode, sem prévia preparação. Aglomerados com diâmetros aproximados de $2\mu\text{m}$ Barra de escala= $2\mu\text{m}$.

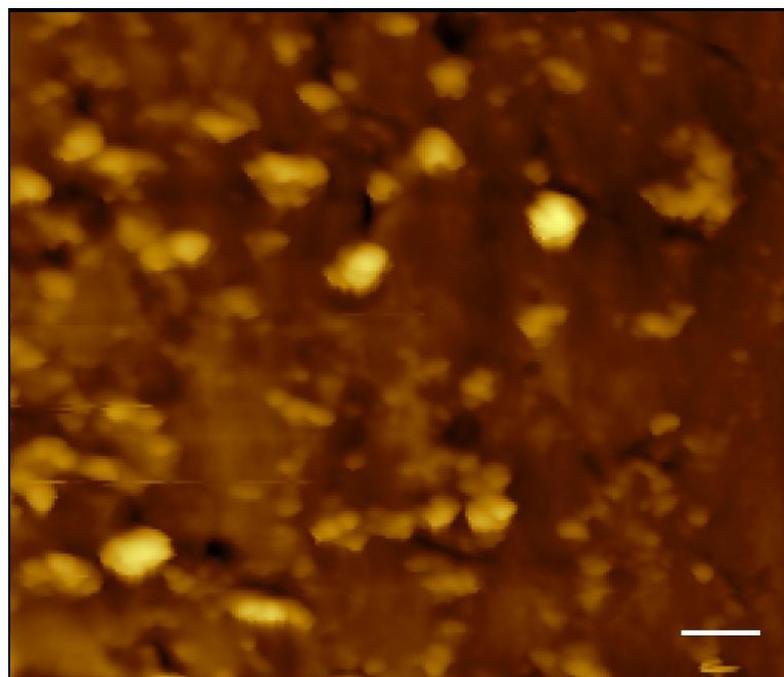


Figura 5.9: Imagem de MFA da catarata imatura, sem preparo. Presença de aglomerados de diâmetro entre 1 e $2\mu\text{m}$. Barra de escala= $2\mu\text{m}$.

5.1.3 Catarata Matura

Amostras com preparação (desidratação, infiltração e corte)

Nesta segunda análise, os cristalinos observados já estão em um grau mais avançado da catarata, entretanto ainda apresentando pequenos pontos de regiões sadias, com alinhamento das fibras. As imagens apresentadas a seguir correspondem à amostra *ccm1*, vide tabela 4.3.

A imagem da figura 5.10 apresentou um conjunto de fibras alinhadas do tecido. É visível a pequena área de organização das fibras no tecido, esta foi obtida a partir da região do córtex do cristalino, tendo as fibras com diâmetros aproximados de $5\mu\text{m}$. Na imagem de MFA, 5.11, as fibras também apresentaram-se de forma alinhada, com diâmetros entre $1\mu\text{m}$ e $2\mu\text{m}$, representando a região do córtex nas proximidades do núcleo. A imagem de MFA, figura 5.12, apresenta com maiores detalhes a região destacada da imagem na figura 5.11.

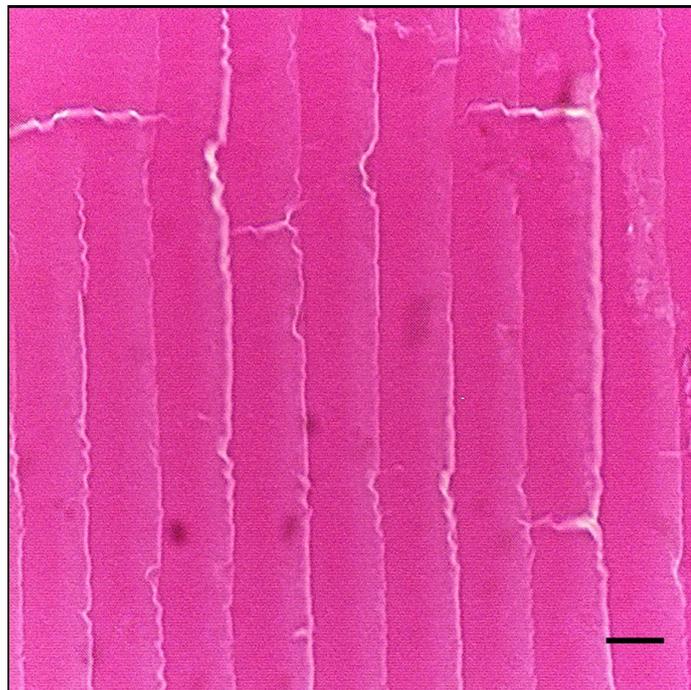


Figura 5.10: Catarata matura da amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada H&E. Barra de escala= $5\mu\text{m}$.

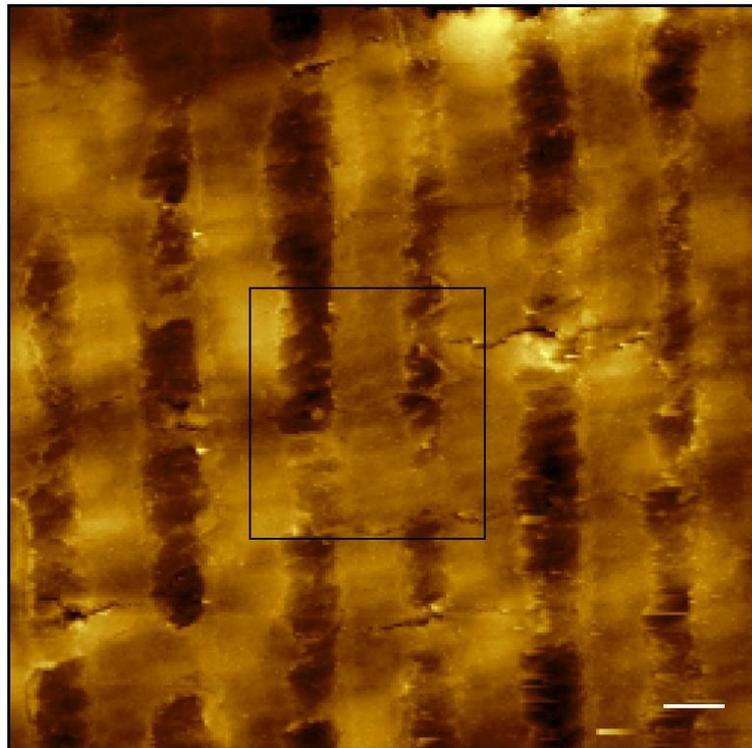


Figura 5.11: Imagem de MFA da catarata madura, amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $3\mu\text{m}$, sem coloração. Barra de escala= $1\mu\text{m}$.

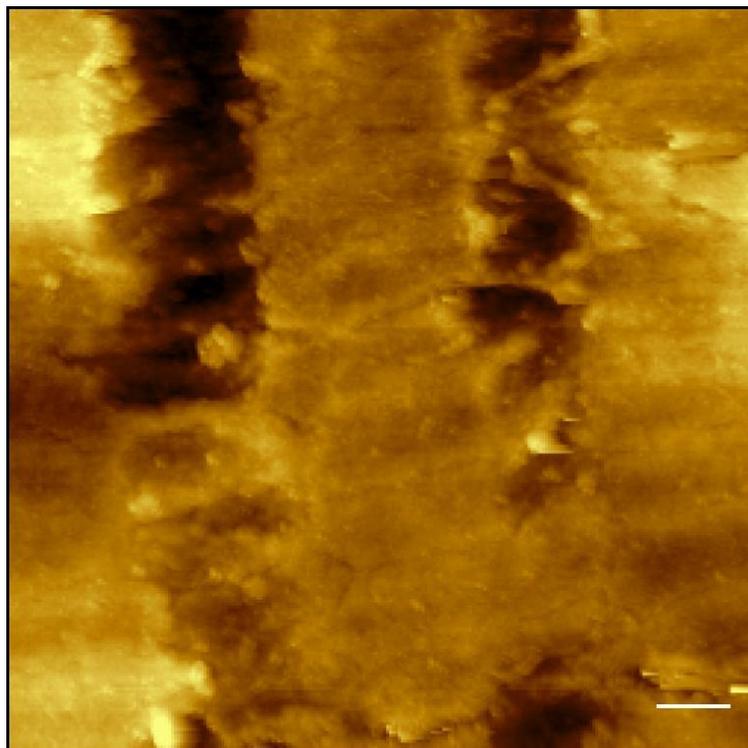


Figura 5.12: Imagem de MFA da catarata madura, amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $3\mu\text{m}$, sem coloração. Barra de escala= $0,5\mu\text{m}$.

Amostras sem preparação - fixação em formol 10%

A seguir constam imagens de catarata matura sem preparação prévia, apenas com a fixação no formol 10% da amostra *ccm2*. O tecido, nestas imagens, não é possível observar as fibras em camadas, apenas o aspecto de "descamação".

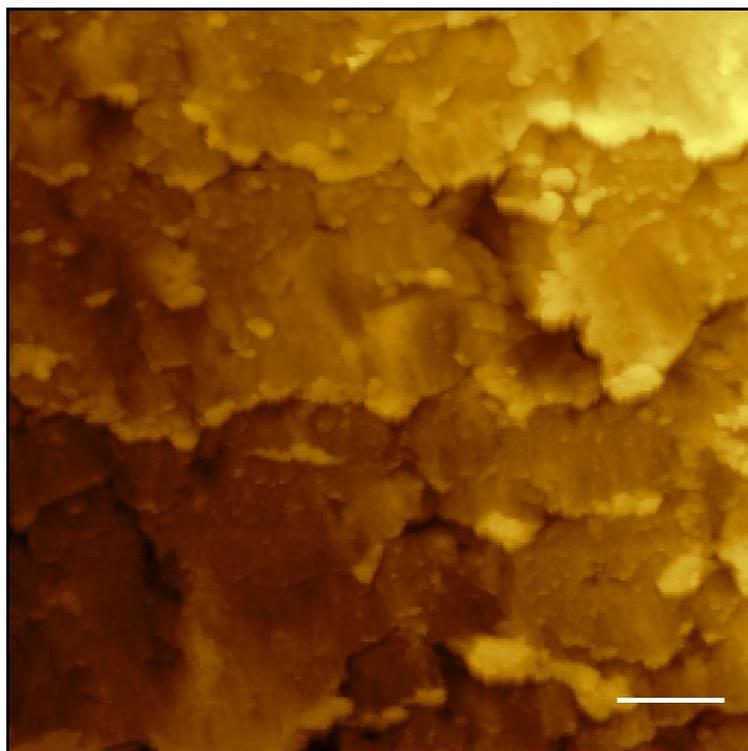


Figura 5.13: Imagem de MFA de catarata matura obtida através do MACMode, sem prévia preparação. Barra de escala= $5\mu\text{m}$.

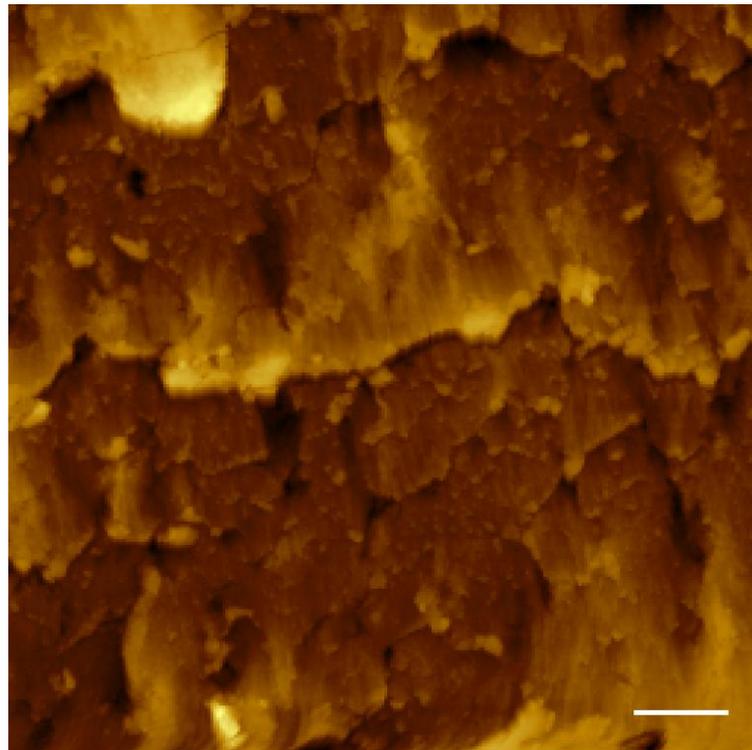


Figura 5.14: Imagem de MFA de catarata madura obtida através do MACMode, sem prévia preparação. Barra de escala= $5\mu\text{m}$.

5.1.4 Catarata Hipermatura

O tecido acometido com catarata hipermatura apresenta opacidade total, e não sendo possível a observação da estruturação geral das fibras que compõem a grande massa do tecido. Do ponto de vista estrutural, corresponde a um tecido com a presença de aglomerados, completamente opacificado, no entanto podendo apresentar em muitos casos, os pontos de processo de reabsorção, nos quais observa-se o retorno da transparência no tecido. A catarata que progride ao ponto de catarata hipermatura apresenta uma liquidação do córtex com o núcleo denso e marrom diminuído dentro da cápsula [70]. Topograficamente, o tecido acometido com a catarata hipermatura apresenta algumas formações estriadas, as quais podem ser visualizadas nas imagens abaixo, obtidas por análise histológica e MFA de uma amostra previamente preparada, vide tabela 4.4.

Amostras com preparação (desidratação, infiltração e corte)

As imagens das figuras 5.15 e 5.16 revelam total ausência das estruturas de fibras dispostas em camadas. A imagem histológica da figura 5.16 é visível um grande aglomerado na região inferior da imagem, caracterizando a doença no estágio mais avançado, com a presença de partículas circulares de até $5\mu\text{m}$ de diâmetro, além do aspecto "estriado" também presente nas imagens obtidas com o MFA da mesma amostra, como mostrado nas figuras 5.17 e 5.18.

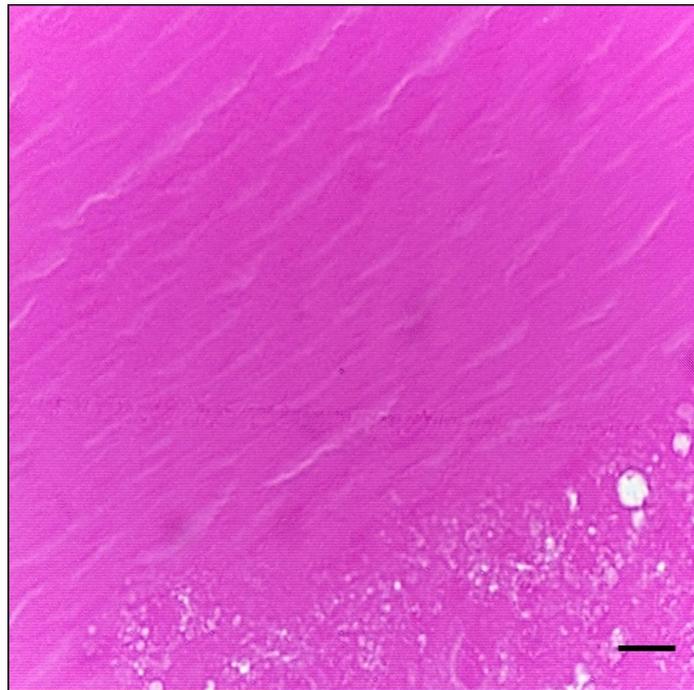


Figura 5.15: Catarata hipermatura da amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Nota-se no canto inferior direito da imagem, pequenos aglomerados circulares de até $5\mu\text{m}$ de diâmetro. Barra de escala= $10\mu\text{m}$.

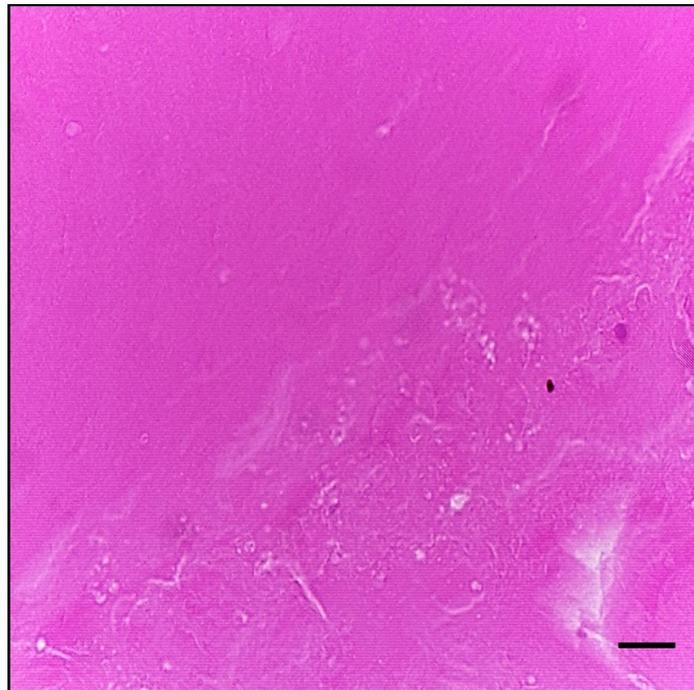


Figura 5.16: Catarata hipermatura da amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada H&E. Barra de escala= $10\mu\text{m}$.

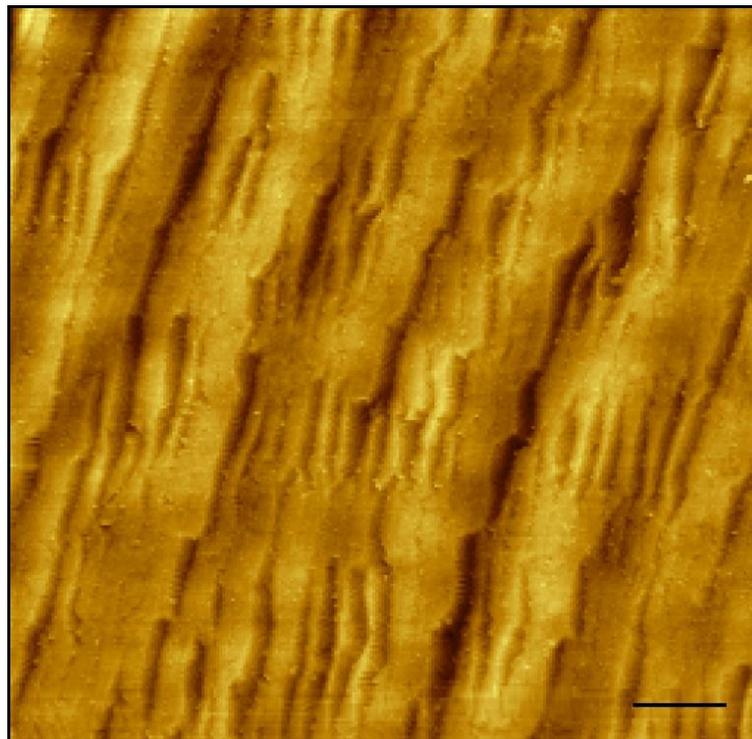


Figura 5.17: Imagem de MFA da catarata hipermatura, amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $3\mu\text{m}$, sem coloração. Barra de escala= $5\mu\text{m}$.

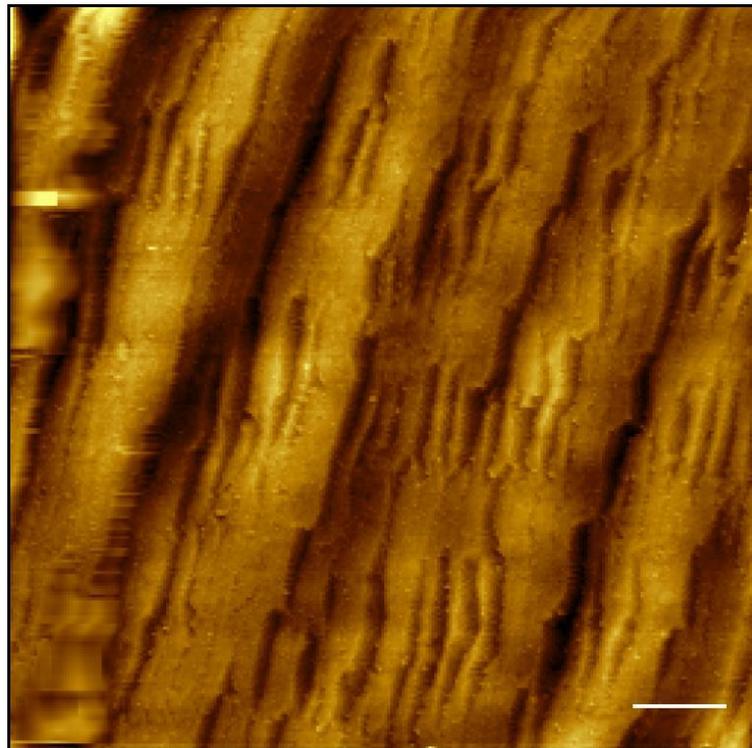


Figura 5.18: Imagem de MFA da catarata hiper-matura, amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $3\mu\text{m}$, sem coloração. Barra de escala= $5\mu\text{m}$.

Amostras sem preparação - fixação em formol 10%

A seguir constam as imagens obtidas com MFA sem preparação prévia de catarata hipermetria. As imagens 5.19 e 5.20 correspondem às imagens da amostra *cch2*, enquanto que as figuras 5.21 e 5.22 são referentes a amostra *cch3*, ambas as amostras foram seccionadas com um bisturi e observadas a seco no microscópio. Em todas as imagens obtidas de catarata hipermetria sem preparação, não é possível se observar qualquer ponto de organização do tecido. Além disso, as imagens de MFA apresentam uma área bastante ínfima da amostra, devido ao fato das amostras apresentarem relevo bastante irregular, ou seja, diferenças de altura limitantes, o que impediu que o equipamento gerasse as imagens completamente.

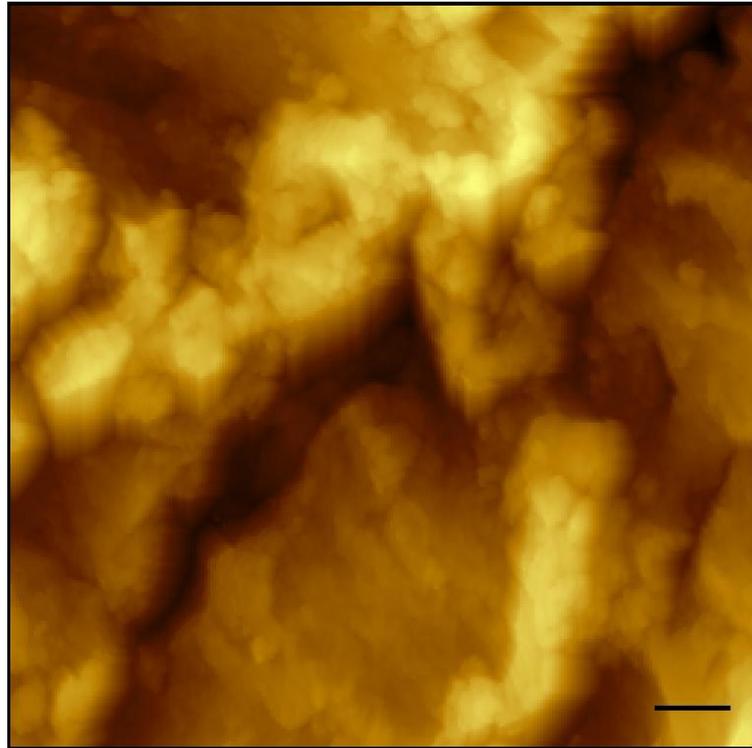


Figura 5.19: Imagem de MFA de catarata hipermetria obtida através do MACMode, sem prévia preparação. Barra de escala= $2\mu\text{m}$.

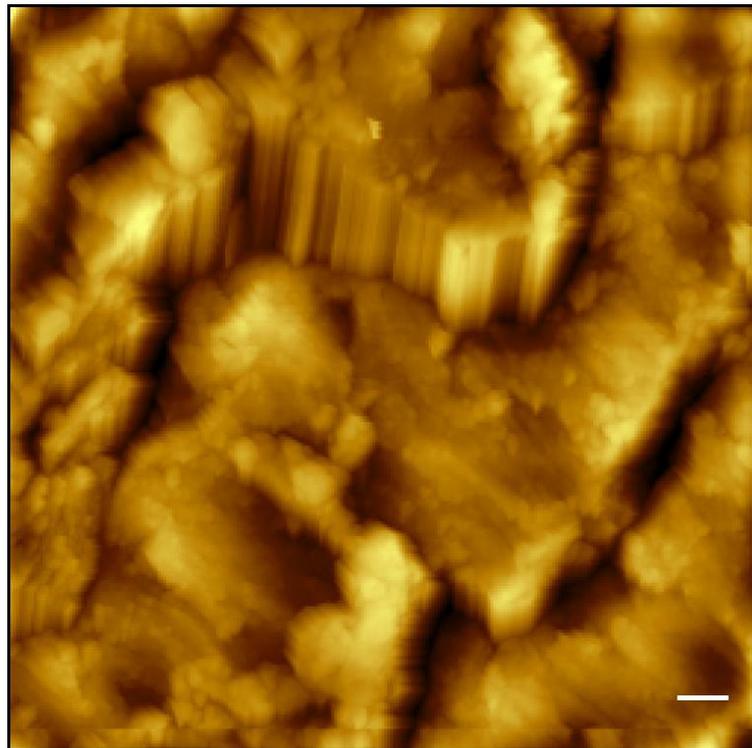


Figura 5.20: Imagem de MFA da catarata hiper-matura, sem preparação prévia. Barra de escala= $2\mu\text{m}$.

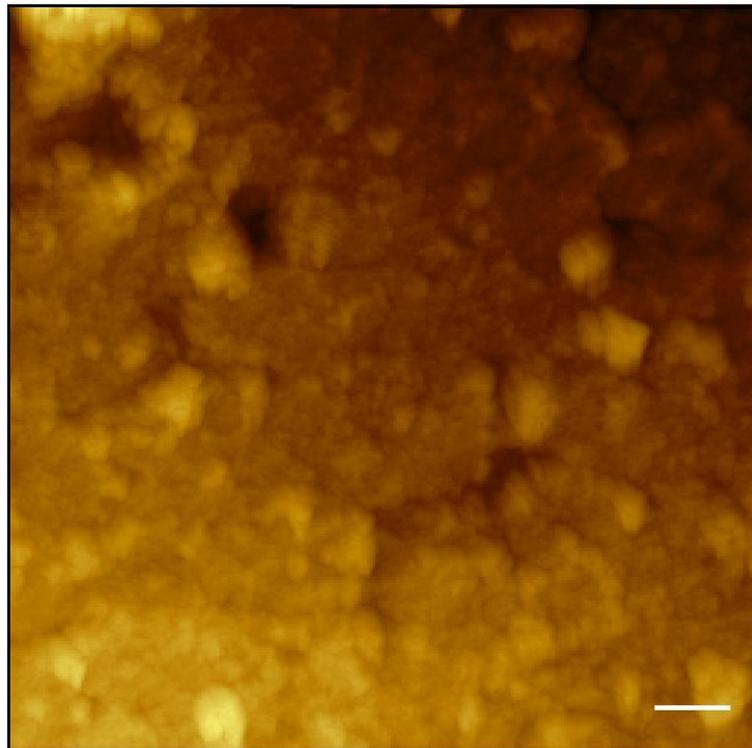


Figura 5.21: Imagem de MFA de catarata hiper-matura obtida através do MACMode, sem prévia preparação. Presença de estruturas circulares com diâmetros variando de 0,5 a $1\mu\text{m}$. Barra de escala= $1\mu\text{m}$.

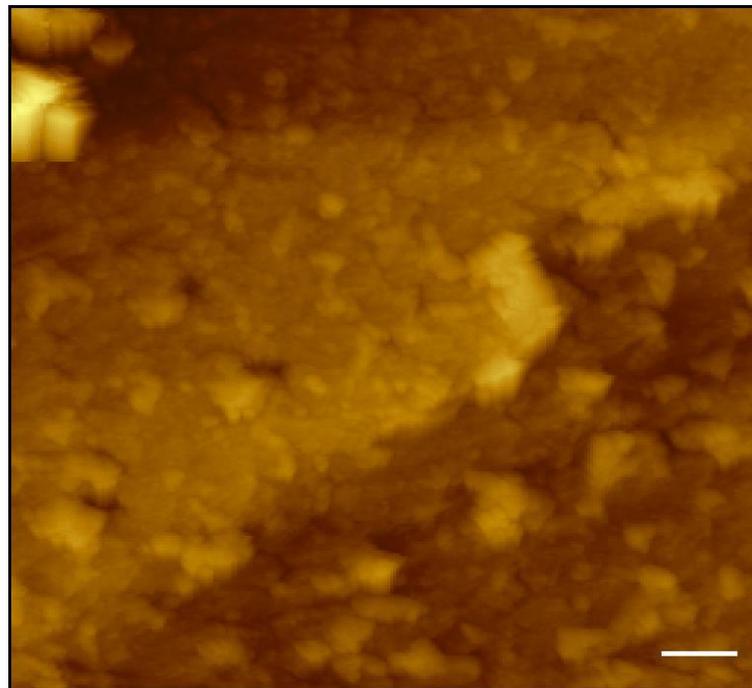


Figura 5.22: Imagem de MFA da catarata hiper-matura, sem preparação prévia. Barra de escala= $2\mu\text{m}$.

5.2 Análise estrutural da córnea por Histologia e MFA

Estruturalmente, a córnea apresenta-se bastante diferente do cristalino. Com o intuito de verificar a aplicabilidade da técnica do MFA para observação de tecidos biológicos em geral, a córnea também foi submetida à análise. Imagens histológicas foram produzidas de modo a comparar a técnica com a MFA. As imagens geradas tanto como MFA como as histológicas corresponderam a tecidos acometidos com o sequestro de córnea.

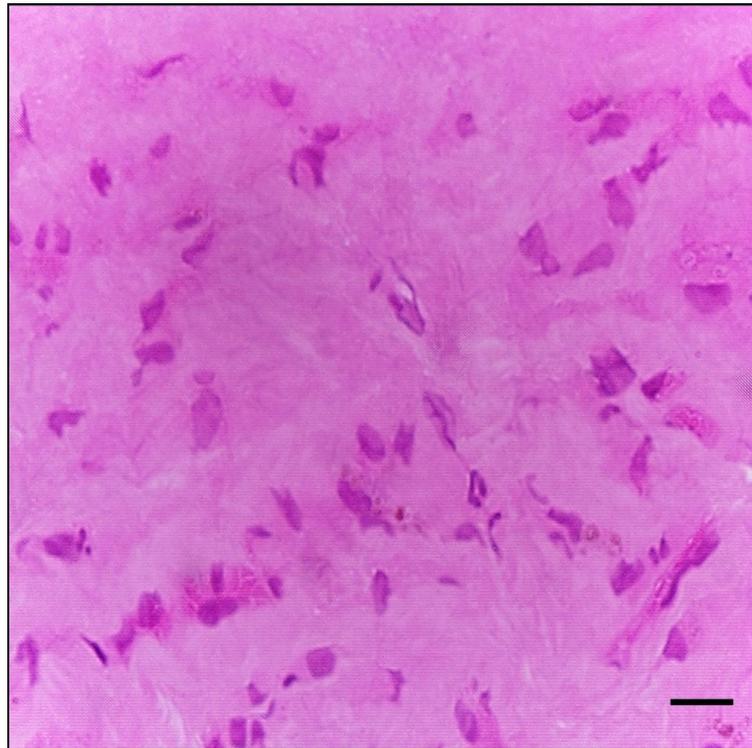


Figura 5.23: Imagem histológica de córnea felina acometida com sequestro na região estromal, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Barra de escala= $5\mu\text{m}$.

As imagens das figuras 5.23 e 5.24, correspondem a amostra *sqc1*, vide tabela 4.5, incluída em resina. As imagens de MFA desta amostra foram impossibilitadas de serem adquiridas devido a quebra da amostra preparada. Estas imagens (5.23 e 5.24) representam a região estromal e região estromal com interface com a membrana basal e o epitélio, respectivamente. Ambas imagens apresentam-se com aspecto de possivelmente um tecido sadio.

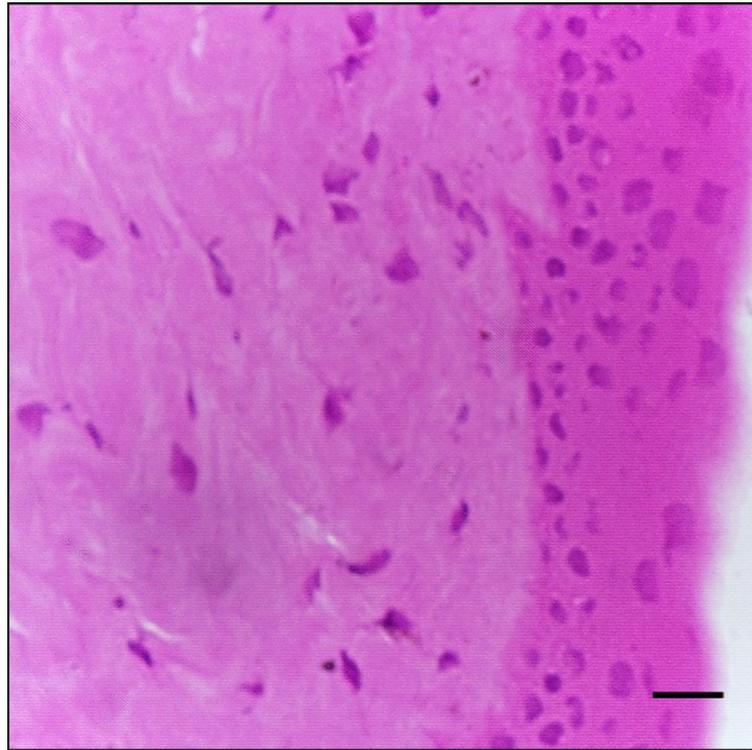


Figura 5.24: Imagem de córnea felina com sequestro da região do estroma e epitélio, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Barra de escala= $10\mu\text{m}$.

As figuras 5.25, 5.26, 5.27 e 5.28 representam a amostra *sqc2*, vide tabela 4.5 foram preparadas através da técnica histológica, as quais foram submetidas a inclusão em parafina.

As imagens histológicas das figuras 5.25 e 5.26 representam a interface entre o estroma corneano e a região epitelial. Apesar do aspecto de tecido sadio, apresentam a degradação do tecido devido à incidência do sequestro na córnea felina, tal fato é verificado devido a presença de algumas estruturas de forma circular a irregular espalhadas pelo tecido, os quais podem ser associados aos fibrócitos, além da presença de neutrófilos que indicam a presença da patologia, diferentemente do tecido não afetado pelo sequestro.

Os fibroblastos são estruturas celulares as quais constituem o tecido conjuntivo e sua função consiste a produção de fibras estruturais, ou seja, a sintetização da matriz extracelular do tecido conjuntivo. Quando os fibroblastos se desenvolvem, eles se tornam fibrócitos, que são responsáveis pela produção das fibrilas de colágeno tipo I e

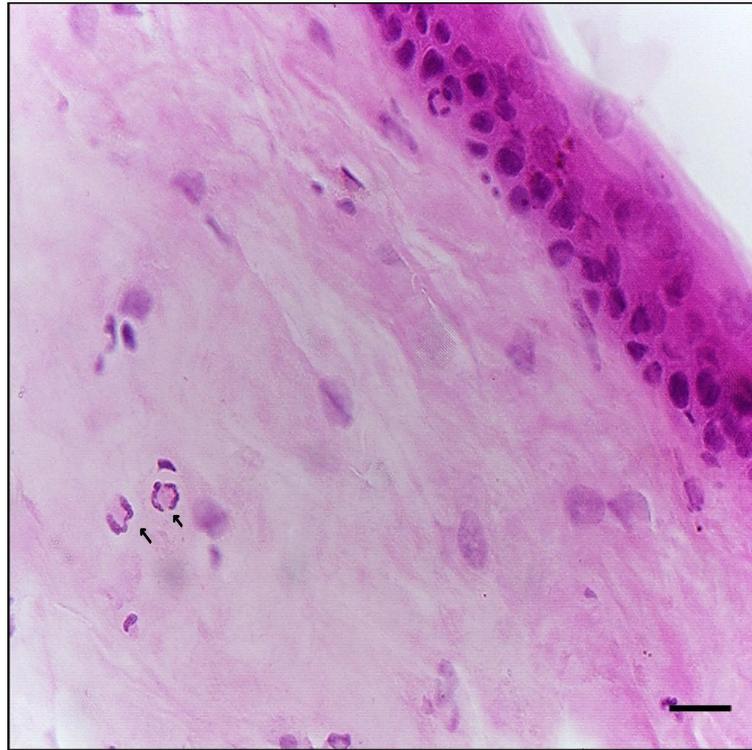


Figura 5.25: Imagem histológica de córnea felina acometida com sequestro, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Região estromal com interface com a região epitelial. As setas representam indicativos de pontos não saudios no tecido. Barra de escala= $10\mu\text{m}$.

substâncias intracelulares, além de dar origem às células pertencentes a outros tipos de tecidos responsáveis inclusive pela regeneração [17]. Os fibrócitos são células de forma ovóide a irregular e na córnea, estes aparecem em grupos de duas ou mais células entre as fibrilas de colágeno. Os neutrófilos correspondem a estruturas ovóides a irregulares, eles constituem em uma classe de células sanguíneas, parte do sistema imunológico, constituindo células leucocitárias. São as primeiras estruturas a se aproximar de um processo inflamatório, e em alguns casos, têm alta capacidade de fagocitação. Os neutrófilos são capazes de fagocitar microorganismos e partículas e tal fato ocorre devido a presença de enzima hidrolíticas e reações com o oxigênio [17]. No caso do sequestro felino, publicações anteriores mostraram a presença de neutrófilos no meio-estroma corneano, devido à reações de processos inflamatórios no tecido [17].

As imagens de MFA, nas figuras 5.27 e 5.28 representam a camada epitelial do

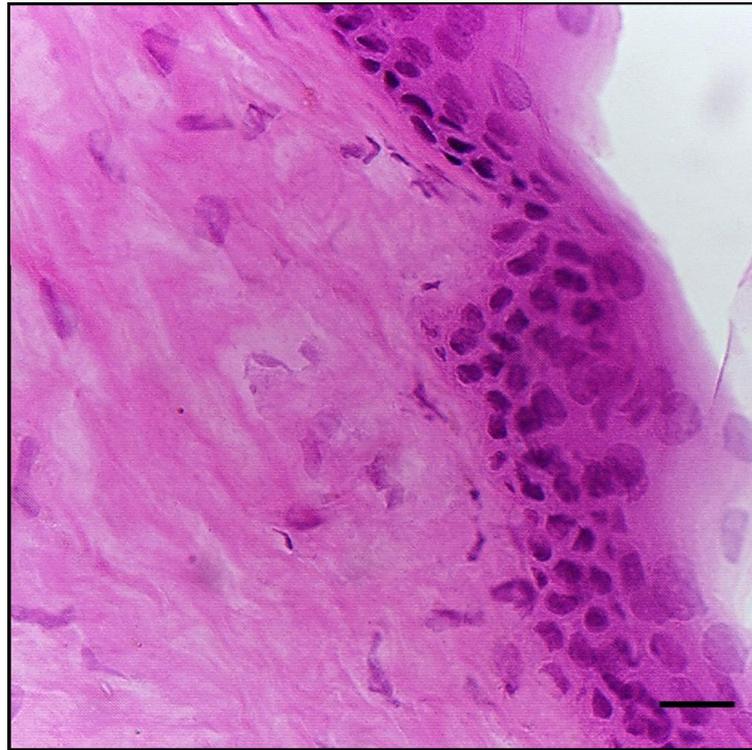


Figura 5.26: Imagem histológica de córnea felina acometida com sequestro, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Barra de escala= $10\mu\text{m}$.

tecido. A camada epitelial corresponde ao nível mais superficial, a imagem de MFA fornece indicativos das células epiteliais e suas microprojeções, ou seja, partículas salientes com aproximadamente 500nm de diâmetro, as quais podem ser visualizadas em publicações anteriores com magnificação menor [17]. As microprojeções são fundamentais para a estabilidade entre o filme lacrimal e o epitélio, a fim de otimizar as funções ópticas. Outra função destas partículas corresponde ao aumento da área de superfície e conseqüentemente facilitando para o acesso de produtos de nutrição e excreção das células [19].

O terceiro e último grupo de imagens correspondeu a amostra *sqc3*, preparada para análise histológica, incluída em resina, correspondendo as figuras 5.29, 5.30, representando as imagens histológicas da região do estroma e as figuras 5.31, 5.32 e 5.33, as imagens obtidas com o MFA também da região do estroma da córnea.

Nas figuras 5.29 e 5.30, indicando a possível presença de fibrócitos, estruturas de forma globular e irregular espalhados pelo estroma, além dos neutrófilos, os quais

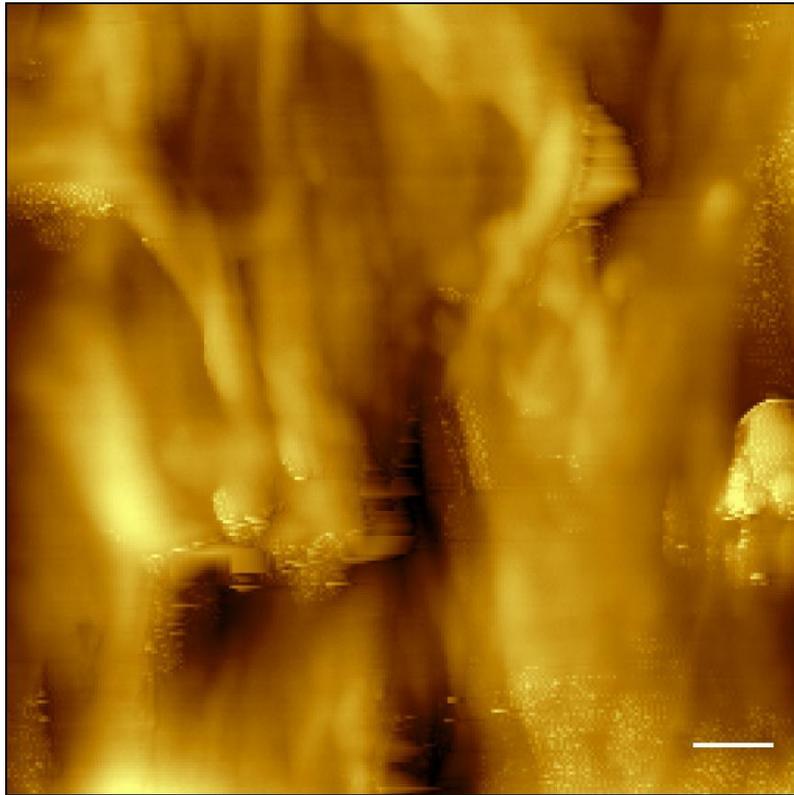


Figura 5.27: Imagem da amostra de córnea felina com sequestro incluída em resina, cortada com espessura de espessura de $3\mu\text{m}$, obtida com MFA no modo MACMode, imagem da região epitelial do tecido. Barra de escala= 500nm .

indicam a presença de um processo inflamatório correspondente à patologia. Como visto nas imagens da amostra anterior *sqc2*.

As imagens de MFA da região estromal da amostra *sqc3*, figuras 5.31, 5.32 e 5.33 mostraram pequenas depressões circulares com aproximadamente $1\mu\text{m}$ de diâmetro, orientadas em uma direção. Estas estruturas podem estar associadas às estruturas próprias do tecido de aspecto sadio ou aos fibroblastos, devido ao seu tamanho e formato. O próprio corte pode ter proporcionado tal depressão, no momento que a lâmina retira a estrutura globular anteriormente presente no tecido.

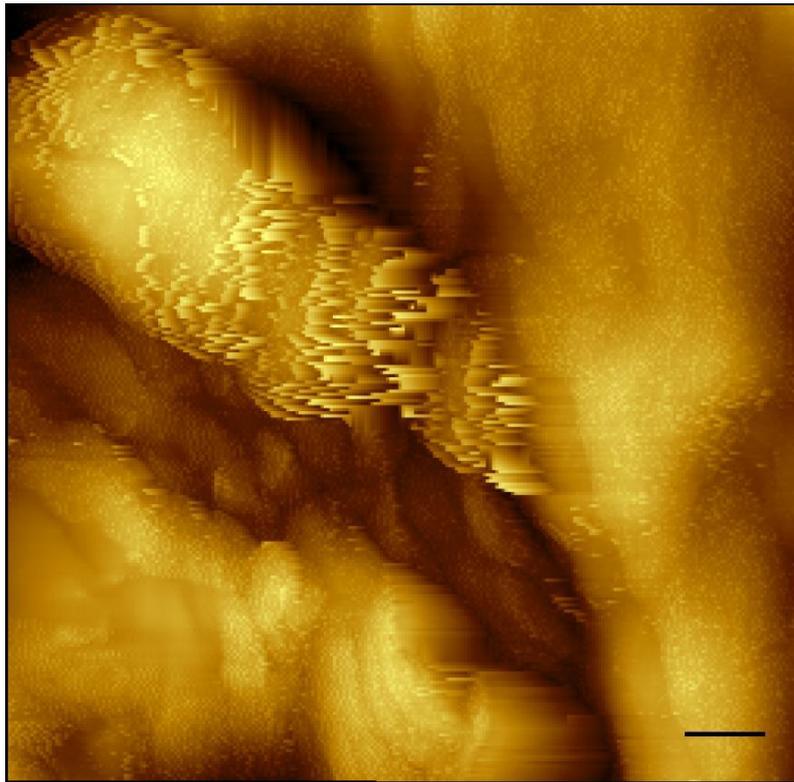


Figura 5.28: Imagem da amostra de córnea felina com sequestro incluída em parafina, cortada com espessura de espessura de $3\mu\text{m}$, imagem da região da camada epitelial, obtida com MFA no modo MACMode. Barra de escala= 500nm .

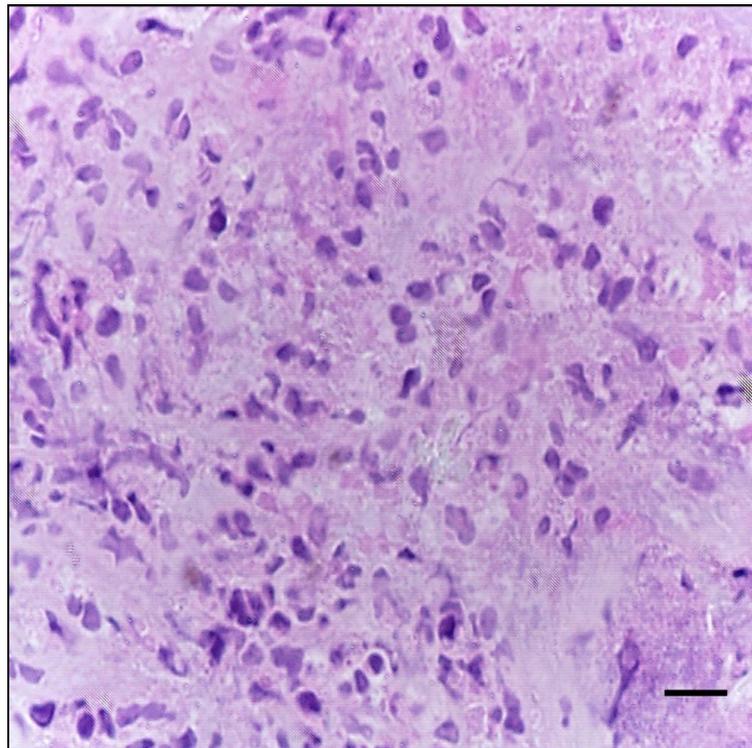


Figura 5.29: Imagem histológica de córnea felina acometida com sequestro, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Região do estroma. Barra de escala= $5\mu\text{m}$.

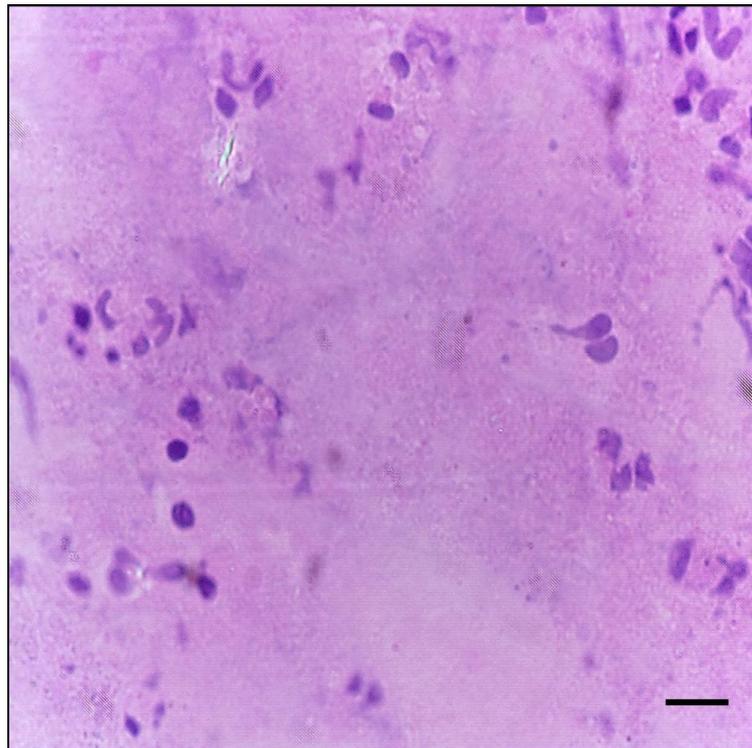


Figura 5.30: Imagem histológica de córnea felina acometida com sequestro, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Região do estroma. Barra de escala= $5\mu\text{m}$.

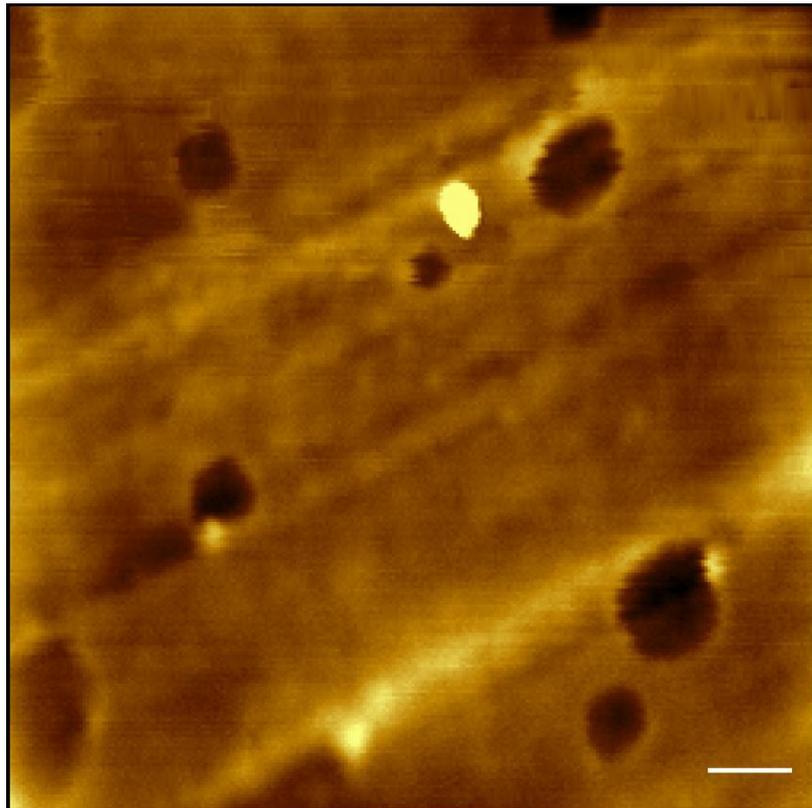


Figura 5.31: Imagem da amostra de córnea felina com sequestro, cortada com espessura de espessura de $3\mu\text{m}$, obtida com MFA no modo MACMode, imagem da região estromal do tecido. Barra de escala= $1\mu\text{m}$.

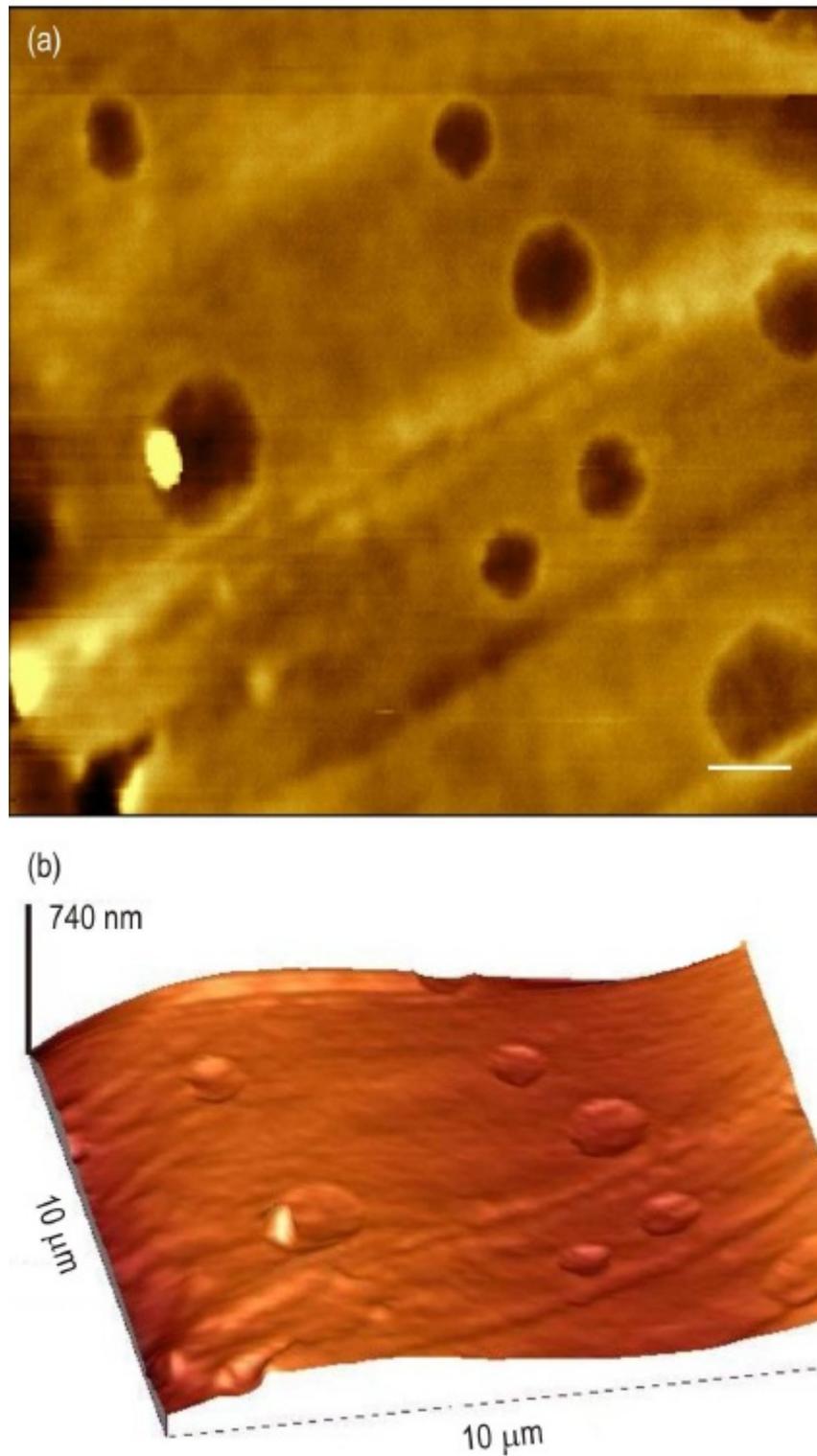


Figura 5.32: a) Imagem da amostra de córnea felina com sequestro, obtida com MFA no modo MACMode, região estromal do tecido. Barra de escala = $1\mu\text{m}$. b) Representação topográfica 3D.

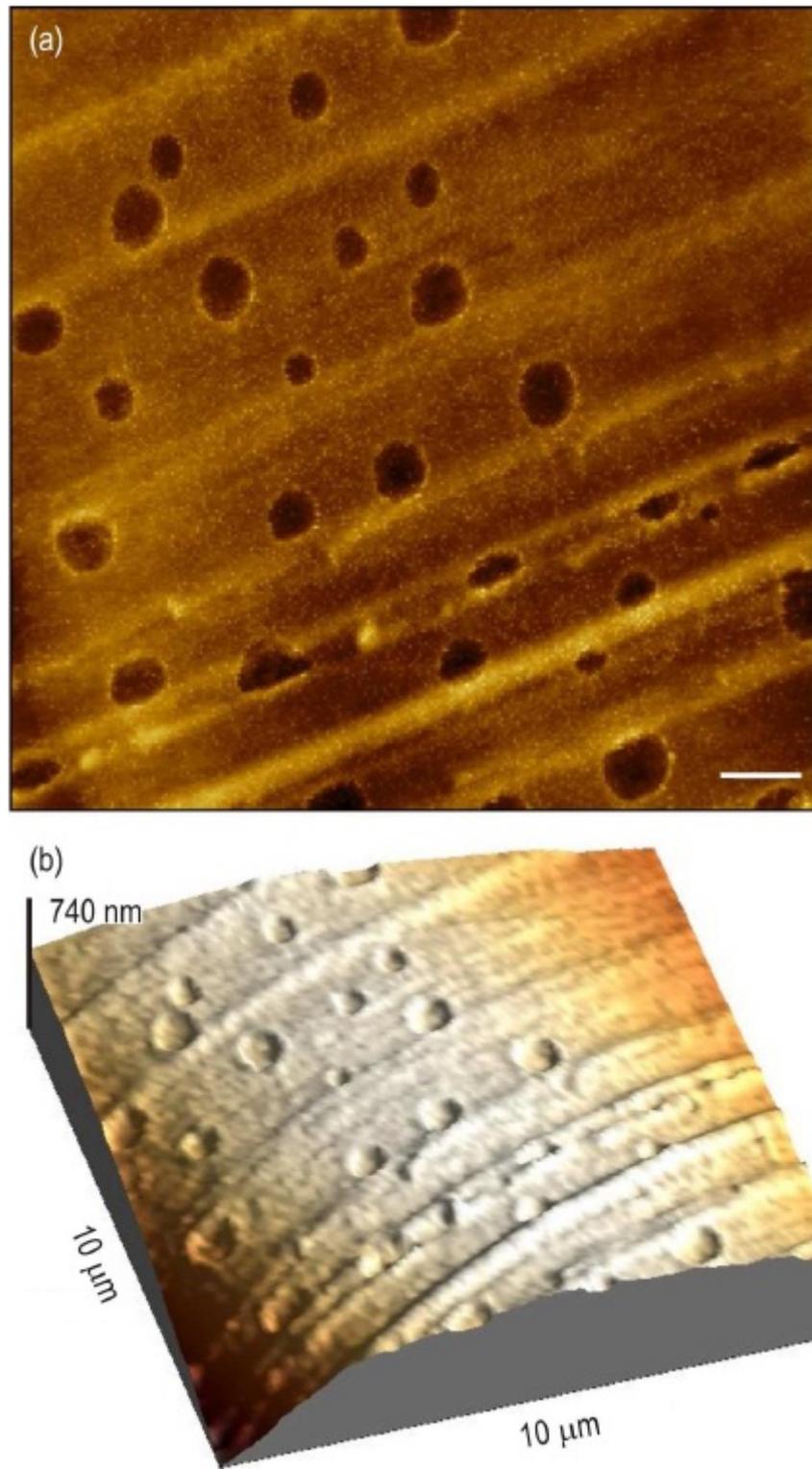


Figura 5.33: a) Imagem da amostra de córnea felina com sequestro, obtida com MFA no modo MACMode, região estromal do tecido. Barra de escala = $1\mu\text{m}$. b) Representação topográfica 3D.

Capítulo 6

Discussões e Conclusões

Um conjunto de propriedades específicas das fibras do cristalino contribuem para a eficiência do MFA na caracterização do tecido sadio, tal como observado nas imagens das figuras 5.1 a 5.4. Nas amostras de tecidos com aspectos sadios apenas fixadas em formol 10%, a tenacidade das estruturas são fatores decisivos. A secção do tecido, tanto transversal quanto longitudinal apresentando as camadas é observável possivelmente pelas condições normais do tecido quando em atividade fisiológica, com os níveis de eletrólitos e hidratação regulados, possibilitando a fixação das fibras em camadas sem pontos de opacidade. Este fato possivelmente permite que o tecido, mesmo após fixado, se torne resistente o suficiente ao corte com o bisturi.

O corte longitudinal expondo o padrão sulco-lingueta foi permitido devido a intensidade da adesão lateral entre as fibras, o que favoreceu o destaque de uma camada de fibras superior com um corte mais grosseiro, feito com o bisturi. Este efeito não foi observado nas imagens das amostras previamente preparadas possivelmente pelo micrótomo se comportar como uma lâmina próxima à ideal, a qual secciona a fibra em si, sem causar o efeito de destacamento de uma camada de fibras superior, como observado com o bisturi. Vale ressaltar que este padrão somente havia sido observado através de MEV, figura 3.7, a custo de trabalhoso processo de preparação da amostra para análise em vácuo.

No caso da catarata imatura, para as amostras previamente preparadas, a imagem de MO de uma região acometida pela doença revelou a presença de vacúolos, vide figura 5.6, tais como na imagem de MFA, também apresentando depressões circulares da

mesma ordem de grandeza, vide figura 5.7. Apesar da presença dos pontos circulares em ambas as imagens, ainda se observa o padrão das fibras dispostas em camadas. Já nas amostras sem preparação prévia, não é possível observar qualquer indício da presença das fibras organizadas em camadas. Uma hipótese pode ser considerada: desequilíbrios eletrolíticos ocorrem com a instauração da catarata no tecido, tais irregularidades funcionais causam acidificação do cristalino fazendo com que ele desidrate-se, em consequência disso, uma redução do tamanho das fibras ocorre, levando ao surgimento de fissuras devido à compactação não uniforme do tecido. Tecidos incluídos em parafinas ou resinas tornam-se mecanicamente mais resistentes, conservando a estrutura original mesmo após o corte com o micrótomo. Já o tecido fixado com o formol torna-se quebradiço, não apresentando a mesma resistência mecânica de uma amostra incluída em parafina ou resina. Nesta situação, corte com um instrumento mais grosseiro, como bisturi, pode causar um colapso das micro-estruturas do tecido, impedindo a observação das fibras em camadas após o corte.

O mesmo ocorre com a catarata matura. Neste estágio da doença, a opacificação do tecido é total, entretanto nas amostras previamente preparadas ainda se observa as estruturas de fibras dispostas em camadas (figuras 5.10 a 5.12), enquanto nas amostras apenas fixadas em formol 10%, o aspecto de descamação é visualizado, vide figuras 5.13 e 5.14.

No caso da catarata hiper-matura, as imagens das amostras previamente incluídas em parafina apresentaram um padrão de estriamento, nos quais não se observa a interface entre as fibras com clareza, vide figuras 5.15 a 5.18, possivelmente relacionado ao ressecamento das fibras devido à instauração da doença. A hipótese de redução do tamanho das fibras foi também levantada para a explicação da compactação não uniforme do cristalino nos casos de catarata hiper-matura observadas através de imagens de raios X [34].

Pontos de reabsorção são passíveis na catarata hiper-matura, estes se caracterizam por ser regiões do retorno da transparência do cristalino, que podem estar ligados a uma re-hidratação das fibras e assim eliminando as fissuras presentes entre as fibras, permitindo a compactação uniforme do tecido.

No estudo das córneas acometidas pelo sequestro, a inclusão do tecido se fez necessária para dar sustentação ao processo de corte. A análise topográfica com MFA da região do estroma revelou a presença de cavidades nanométricas, vide figuras 5.32 e 5.33. Embora os diâmetros das cavidades sejam próximos do tamanho típico das estruturas observáveis no MO, o número de cavidades por unidade de área permite descartar que algumas destas ocasionem o surgimento das cavidades. Em outras palavras, qualquer que seja a origem das cavidades elas provavelmente independem das estruturas celulares observáveis na histologia. Contudo podem estar associadas à outras estruturas globulares presentes no tecido, que não produzam contraste com os corantes utilizados e/ou que foram eliminados durante o corte. Não se pode também descartar a possibilidade das cavidades serem um artefato do processo de preparação da amostra. De qualquer modo, uma investigação rigorosa se faz necessária para esclarecer a natureza precisa das cavidades e a relação delas com o sequestro.

As conclusões mais importantes neste estudo foram as seguintes: *i)* as informações obtidas pelo MFA estão relacionadas, direta ou indiretamente, às propriedades mecânicas do tecido e à resposta ao processo de corte; *ii)* devido às particularidades da estrutura de fibras do cristalino, uma caracterização detalhada, com resolução comparável somente àquela alcançada na microscopia eletrônica, pode ser realizada no **tecido sadio** sem a necessidade de preparação prévia; *iii)* na avaliação da catarata em estágios avançados (matura e hiper-matura), embora a riqueza de detalhes seja menor do que aquela obtido no tecido sadio, o MFA pode fornecer informações do tecido, entretanto necessita da preparação prévia das amostras; e *iv)* para a córnea, a aplicabilidade do MFA é mais limitada, mas ainda assim pode fornecer informações complementares ou ao mínimo, comparáveis com a das análises histológicas.

Lista de Figuras

1.1	A função do cristalino é focalizar a luz dos objetos na retina, tornando-os nítidos. Quando acometido pela catarata, alterações no tecido do cristalino passam a atuar como centros espalhadores de luz, prejudicando a visão e podendo levar à cegueira total.	8
1.2	Sistema ocular e suas principais estruturas.	9
1.3	Imagens de cristalinos inteiros (dimensões de aproximadamente 2 cm de diâmetro), obtidas por radiografia de raios X de luz Síncrotron. Presença de cálcio (setas brancas) na região cortical são presentes na maioria dos casos de catarata parcial, enquanto que fissuras radiais (setas pretas) devido à compactação de fibras celulares são observadas nos casos de catarata total independentemente da ocorrência da presença de cálcio. Veja referência [34] para maiores detalhes.	10
3.1	Esquema tridimensional do cristalino, indicando as estruturas inerentes ao tecido. As imagens ilustradas no esquema representam as imagens geradas através do MFA.	16
3.2	Esquema tridimensional do cristalino, indicando as regiões do tecido: pólo anterior, cuja posição é referida devido à presença da camada epitelial; pólo posterior, na qual cápsula e fibras estão em contato e equador.	17
3.3	Microscopia de luz da lente humana. As principais estruturas são indicadas [45].	18

- 3.4 Esquema simplificado da região anterior do cristalino, nota-se as três regiões da camada epitelial: células quiescentes da zona central, células em divisão da zona germinativa e células em diferenciação da zona equatorial [61]. 19
- 3.5 Esquema simplificado do funcionamento da bomba de sódio/potássio [65]. 19
- 3.6 Esquema representativo da formação das fibras do cristalino e a sutura em forma de Y [67]. 20
- 3.7 Padrão do sulco-lingueta observado através de microscopia eletrônica de varredura das fibras [45]. A figura apresenta um campo de aproximadamente $8\mu\text{m}$ de largura, já as fibras representadas na imagem correspondem àquelas constituintes do córtex profundo. 22
- 3.8 Casos de catarata canina em diferentes estágios de desenvolvimento da doença. 25
- 3.9 Diagrama representando uma secção transversal de uma córnea saudável felina e suas estruturas correspondentes. 27
- 3.10 Felino com a córnea acometida pela patologia no estágio inicial, tipo II. 29
- 3.11 Esquema da preparação de tecidos para observação com MO ou MFA. 30
- 3.12 Fixadores utilizados na conservação dos tecidos para observação com microscopia de força atômica. 33
- 3.13 Estrutura básica do MFA: unidade do microscópio (estágio para amostra, *scanner* piezelétrico, laser, ponta, cantiléver e fotodetector), unidade de controle e computador. 34
- 3.14 Esquema do microscópio sob o ponto de vista do processo de obtenção da imagem. 35
- 3.15 Esquema de varredura do *scanner*. Os pontos correspondem às regiões de varredura, na qual, pontos na linha horizontal correspondem à varredura rápida. A varredura lenta é relacionada a direção vertical. 36
- 3.16 Esquema de contração e expansão do *scanner* de acordo com a aplicação da voltagem. O material piezelétrico se deforma. 37
- 3.17 Esquema dos quadrantes do fotodetector. O laser deve ser alinhado no centro dos quatro quadrantes. 38

- 3.18 Força versus distâncias (entre ponta e amostra). A força de van der Waals é alterada acordo com o modo de operação do equipamento. Os modos contato intermitente e contato associam-se às forças repulsivas, enquanto que o modo não contato está relacionado à força atrativa. 39
- 3.19 Esquema de oscilação do sistema MACMode, controle por modulação magnética. 42
- 3.20 Esquemática da geração do sinal por MFM, no qual a deflexão maior do cantilever representa regiões de maior dureza e a deflexão menor do cantilever, a área de maior elasticidade. 43
- 4.1 Equipamento PicoScan SPM I, utilizado para avaliações e obtenção das imagens de alta resolução. 48
- 5.1 a) Imagem de MFA obtidas através do MACMode de um cristalino de coelho sadio na região cortical, mostrando as fibras no corte longitudinal, vide figura 3.1. b) Detalhe do relevo mostrando a variação da altura Z ao longo da linha indicada em a). A periodicidade observada da ordem de $4\mu\text{m}$ está relacionada ao diâmetro das fibras. Barra de escala= $2\mu\text{m}$ 54
- 5.2 a) Imagem de MFA obtidas através do MACMode de um cristalino de coelho sadio. A imagem ilustra as fibras no corte transversal, os valores de diâmetro foram obtidos, correspondendo em média a $5\mu\text{m}$, na região cortical da amostra, barra de escala= $3\mu\text{m}$. b) Área demarcada em a) em maior aumento, barra de escala= $2\mu\text{m}$ 55
- 5.3 Imagem de MFA obtida através do modo de contato intermitente AC na região sadia da amostra *cci1*. A imagem ilustra as fibras no corte longitudinal da região do córtex. O processo de corte expôs as fibras sem dano às fibras, sendo possível visualizar o padrão sulco-lingueta. Barra de escala= $2\mu\text{m}$ 56

- 5.4 Região sadia de um cristalino com catarata imatura adquirida através de MFA no modo contato intermitente AC da amostra *cci1*. A imagem ilustra as fibras no corte longitudinal da região do córtex. O processo de corte expôs as fibras, rompendo uma das camadas de fibras permitindo a visualização de interface entre as camadas, sendo possível visualizar o padrão sulco-lingueta. Barra de escala= $2\mu\text{m}$ 57
- 5.5 Imagem histológica de uma região sadia de cristalino acometido com catarata imatura, em corte longitudinal, amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Barra de escala= $5\mu\text{m}$ 59
- 5.6 Catarata imatura, amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Nota-se a presença de estruturas circulares na imagem. Barra de escala= $10\mu\text{m}$ 60
- 5.7 Imagem de MFA da catarata imatura, amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $3\mu\text{m}$, sem coloração. As flechas indicam buracos na estrutura fibrosa, provavelmente relativos às estruturas circulares esbranquiçadas observadas na imagem histológica. Barra de escala= $5\mu\text{m}$ 61
- 5.8 Imagem de MFA de catarata imatura obtida através do MACMode, sem prévia preparação. Aglomerados com diâmetros aproximados de $2\mu\text{m}$ Barra de escala= $2\mu\text{m}$ 62
- 5.9 Imagem de MFA da catarata imatura, sem preparo. Presença de aglomerados de diâmetro entre 1 e $2\mu\text{m}$. Barra de escala= $2\mu\text{m}$ 63
- 5.10 Catarata matura da amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada H&E. Barra de escala= $5\mu\text{m}$ 64
- 5.11 Imagem de MFA da catarata matura, amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $3\mu\text{m}$, sem coloração. Barra de escala= $1\mu\text{m}$ 65
- 5.12 Imagem de MFA da catarata matura, amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $3\mu\text{m}$, sem coloração. Barra de escala= $0,5\mu\text{m}$ 66
- 5.13 Imagem de MFA de catarata matura obtida através do MACMode, sem prévia preparação. Barra de escala= $5\mu\text{m}$ 67

- 5.14 Imagem de MFA de catarata matura obtida através do MACMode, sem prévia preparação. Barra de escala= $5\mu\text{m}$ 68
- 5.15 Catarata hipermatura da amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Nota-se no canto inferior direito da imagem, pequenos aglomerados circulares de até $5\mu\text{m}$ de diâmetro. Barra de escala= $10\mu\text{m}$ 70
- 5.16 Catarata hipermatura da amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada H&E. Barra de escala= $10\mu\text{m}$ 71
- 5.17 Imagem de MFA da catarata hipermatura, amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $3\mu\text{m}$, sem coloração. Barra de escala= $5\mu\text{m}$ 72
- 5.18 Imagem de MFA da catarata hipermatura, amostra incluída em parafina, cortada com espessura de $3\mu\text{m}$, sem coloração. Barra de escala= $5\mu\text{m}$ 73
- 5.19 Imagem de MFA de catarata hipermatura obtida através do MACMode, sem prévia preparação. Barra de escala= $2\mu\text{m}$ 74
- 5.20 Imagem de MFA da catarata hipermatura, sem preparação prévia. Barra de escala= $2\mu\text{m}$ 75
- 5.21 Imagem de MFA de catarata hipermatura obtida através do MACMode, sem prévia preparação. Presença de estruturas circulares com diâmetros variando de 0,5 a $1\mu\text{m}$. Barra de escala= $1\mu\text{m}$ 76
- 5.22 Imagem de MFA da catarata hipermatura, sem preparação prévia. Barra de escala= $2\mu\text{m}$ 77
- 5.23 Imagem histológica de córnea felina acometida com sequestro na região estromal, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Barra de escala= $5\mu\text{m}$ 78
- 5.24 Imagem de córnea felina com sequestro da região do estroma e epitélio, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Barra de escala= $10\mu\text{m}$. 79
- 5.25 Imagem histológica de córnea felina acometida com sequestro, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Região estromal com interface com a região epitelial. As setas representam indicativos de pontos não sadios no tecido. Barra de escala= $10\mu\text{m}$ 80

- 5.26 Imagem histológica de córnea felina acometida com sequestro, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Barra de escala= $10\mu\text{m}$ 81
- 5.27 Imagem da amostra de córnea felina com sequestro incluída em resina, cortada com espessura de espessura de $3\mu\text{m}$, obtida com MFA no modo MACMode, imagem da região epitelial do tecido. Barra de escala= 500nm . 82
- 5.28 Imagem da amostra de córnea felina com sequestro incluída em parafina, cortada com espessura de espessura de $3\mu\text{m}$, imagem da região da camada epitelial, obtida com MFA no modo MACMode. Barra de escala= 500nm . . 83
- 5.29 Imagem histológica de córnea felina acometida com sequestro, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Região do estroma. Barra de escala= $5\mu\text{m}$ 84
- 5.30 Imagem histológica de córnea felina acometida com sequestro, cortada com espessura de $2\mu\text{m}$ e corada com H&E. Região do estroma. Barra de escala= $5\mu\text{m}$ 85
- 5.31 Imagem da amostra de córnea felina com sequestro, cortada com espessura de espessura de $3\mu\text{m}$, obtida com MFA no modo MACMode, imagem da região estromal do tecido. Barra de escala= $1\mu\text{m}$ 86
- 5.32 a) Imagem da amostra de córnea felina com sequestro, obtida com MFA no modo MACMode, região estromal do tecido. Barra de escala= $1\mu\text{m}$. b) Representação topográfica 3D. 87
- 5.33 a) Imagem da amostra de córnea felina com sequestro, obtida com MFA no modo MACMode, região estromal do tecido. Barra de escala= $1\mu\text{m}$. b) Representação topográfica 3D. 88

Lista de Tabelas

3.1	Sumário do resultado da coloração com H&E.	32
4.1	Descrição das amostras de crystalino sadios (cs) e com catarata imatura (cci) utilizados para identificação e caracterização das estruturas do tecido, indicando o animal e raça, condições do tecido e técnicas utilizadas para a análise.	49
4.2	Descrição das amostras de cristalino acometidos com catarata imatura (cci) utilizados para caracterização dos tecidos, indicando o animal e raça, condições do tecido e técnicas utilizadas para a análise.	49
4.3	Descrição das amostras de cristalino acometidos com catarata matura (ccm) utilizados para caracterização dos tecidos, indicando o animal e raça, condições do tecido e técnicas utilizadas para a análise.	50
4.4	Descrição das amostras de cristalino acometidos com catarata hiper-matura (cch) utilizados para caracterização dos tecidos, indicando o animal e raça, condições do tecido e técnicas utilizadas para a análise.	50
4.5	Descrição das amostras de córnea acometidos com sequestro (sqc) utilizados para caracterização dos tecidos, indicando o animal e raça, condições do tecido e técnicas utilizadas para a análise.	51

Referências Bibliográficas

- [1] Brian, G., H. Taylor, *Cataract blindness - challenges for the 21st century*. Bulletin of the World Health Organization 79: 249-256 (2001);
- [2] Temporini, E. R., Kara-José, N., *A perda da visão - Estratégias de prevenção*. Arq. Bras. Oftalmol. 67(4):597-601 (2004);
- [3] Yamamoto, S., J. Hitomi, S. Sawaguchi, H. Abe, T. Ushiki, *Observation of Human Corneal and Scleral Collagen Fibrils by Atomic Force Microscopy*. Jpn Ophthalmological. 46: 496-501 (2002);
- [4] Yamamoto, S., J. Hitomi, M. Shigeno, S. Sawaguchi, H. Abe, T. Ushiki, *Atomic Force Microscopy Studies of Isolated Collagen Fibrils of the Bovine Cornea and Sclera*. Arch Hystol. Cytol. 60: 371-378 (1997);
- [5] Jouve, F., K. Hanna, *Shape optimization of an accommodative intra-ocular lens*. Comptes Rendus 333:243-248 (2005);
- [6] Brockmann, C., M. Schulz, T. Laube, *Transmittance characteristics of ultraviolet and blue-light-filtering intraocular lenses*. Journal of Cataract & Refractive Surgery 34: 1161-1166 (2008);
- [7] Basti, S., P. Garg, M. K. Reddy, *Posterior capsule dehiscence during phacoemulsification and manual extracapsular cataract extraction: comparison of outcomes*. Journal of Cataract and Refractive Surgery 29: 532-536 (2003);
- [8] Kim, J., S. Jeong, H. Han, D. Williams, *Evaluation of sutureless cataract surgery in the dog*. Intern Journal Appl Res Vet Med 6: 101-110 (2008);

- [9] Slatter, D.H., *Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. W.B. Saunders, 2nd edition (1990);
- [10] Maehara, S., N. Itoh, S. Wakaiki, A. Yamasaki, K. Tsuzuki, Y. Izumisawa, *The effects of cataract stage, lens-induced uveitis and cataract removal on ERG in dogs with cataract*. *Veterinary Ophthalmology* 10 (5): 308 - 312 (2007);
- [11] Khng, C., R. H. Osher, *Evaluation of the relationship between corneal diameter and lens diameter*. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 34: 475-479 (2008);
- [12] Antunes, A., M. G. Hönnicke, A. M. V. Safatle, C. Cusatis, P. S. Moraes Barros, S. L. Morelhão, *Diffraction enhanced X-ray imaging of mammals crystalline lens*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 238: 28-31 (2005);
- [13] Olsen, T., S. Sanderson, X. Feng, W. Hubbard, *Porcine Sclera: Thickness and Surface Area*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43(8): 2529-2532 (2001);
- [14] Antunes, A., M. G. Hönnicke, A. M. V. Safatle, C. Cusatis, P. S. Moraes Barros, S. L. Morelhão, *Diffraction enhanced X-ray imaging of mammals crystalline lens*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 238: 28-31 (2005);
- [15] Freel, C., K. Al-Ghoul, J. Kuszak, M. Costello, *Analysis of nuclear fiber cell compaction in transparent and cataractous diabetic human lenses by scanning electron microscopy*. *BMC Ophthalmology* 3:1 (2003);
- [16] Ortiz, D., J. L. Alió, J. Ruiz-Colechá, U. Oser, *Grading nuclear cataract opacity by densitometry and objective optical analysis*. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 34: 1345-1352 (2008);
- [17] Cullen, C. L., D.W., Wadowska, A. Singhand, Y. Melekhovets. *Ultrastructural findings in feline corneal sequestra*. *Veterinary ophthalmology* 8: 295-303 (2005);
- [18] Meller, D., K. Peters, K. Meller, *Human cornea and sclera studied by atomic force microscopy*. *Cell Tissue Res* 288: 111-118 (1997);

- [19] Lombardo, M., M. P. De Santo, G. Lombardo, R. Barberi, S. Serrao, *Atomic force microscopy analysis of normal and photoablated porcine corneas*. Journal of Biomechanics 39: 2719-2724 (2006);
- [20] Johnson, K. *Histology and Cell Biology*. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 2nd edition (1991);
- [21] Ross, M. H., Pawlina, W., *Histology: A Text and Atlas*. Lippincott Williams & Wilkins, 5th edition (2005);
- [22] Al-Ghoul, K., L. Novak, J. Kuszak, *The structure of posterior subcapsular cataracts in the royal college of surgeons (RCS) rats*. Exp Eye Res 64: 163-177 (1998);
- [23] Khorramshahi, O., J. M. Schartau, R. H.H. Kröger, *A complex system of ligaments and a muscle keep the crystalline lens in place in the eyes of bony fishes (teleosts)* Vision Research 48: 1503-1508 (2008);
- [24] Al-khudari, S., S. T. Donohue , W. M. Al-Ghoul, K. J. Al-Ghoul, *Age-related compaction of lens fibers affects the structure and optical properties of rabbit lenses* . BMC Ophthalmology 7: 19 (2007);
- [25] Wanko, T., M. Gavin, *Electron Microscope Study of Lens Fibers*. J. Biophys. and Biochem. Cytol. 6: 97-102 (1959);
- [26] Saika S., S. Ohmi, S. Tanaka; Y. Onishi, A. Yamanaka, A. Ooshima, *Light and scanning electron microscopy of rabbit lens capsules with intraocular lenses*. Journal of cataract and refractive surgery 23: 787-794 (1997);
- [27] Nobuyuki, S., T. Tetsuo, K. Michiji *Scanning Electron Microscopic Study of Lens Epithelial Cells in Atopic and Age-related Anterior Polar Cataract*. Journal of the Eye 17;107-111 (2000);
- [28] Rini, F., B. Worgul, G. Merriam Jr., *Scanning electron microscopic analysis of radiation cataracts in rat lenses. I. X-radiation cataractogenesis as a function of dose. 1:* Ophthalmic Res. 15(3):146-159 (1983);

- [29] Nicoli, S., G. Ferrari, M. Quarta, C. Macaluso, P. Govoni, D. Dallatana, P. Santi, *Porcine sclera as a model of human sclera for in vitro transport experiments: histology, SEM, and comparative permeability*. Mol Vis. 15: 259-266 (2009).
- [30] Davoine, B. R. *The scanning electron microscope*. Ann Univ Lyon Sci Sect B[3] 10: 78-86 (1957);
- [31] Amelinckx, S., D. van Dyck, J. van Landuyt, G. van Tendeloo, *Electron Microscopy - Principles and fundamentals*. Weinheim: VCH (1997);
- [32] Griffiths, G. *Bringing electron microscopy back into focus for cell biology*. Trends Cell Biol 11:153-154(2001);
- [33] McIntosha, J. *Electron Microscopy of Cells: A New Beginning for a New Century*. The Journal of Cell Biology 153 (6): 25-32 (2001);
- [34] Antunes, A., A. Safatle, P. Barros, S. Morelhão, *X-ray imaging in advanced studies of ophthalmic diseases*. Medical Physics 33: 2338-2343(2006);
- [35] Binning, G., C. Quate, C. Gerber, *Atomic Force Microscopy*. Phys. Rev. Lett. 56: 930-933 (1986);
- [36] Paige, M., J. Rainey, M. Goh, *A study of fibrous long spacing collagen ultrastructure and assembly by atomic force microscopy*. Micron 32: 341-353 (2001);
- [37] Ushiki, T., J. Hitomi, S. Ogura, T. Umemoto, M. Shigeno, *Atomic Force Microscopy in Histology and Cytology*. Arch Hystol. Cytol. 59: 421-431 (1996);
- [38] Venturoni M., T. Gutschmann, G. Fantner, J. Kindt, P. Hansma, *Investigations into the polymorphism of rat tail tendon fibrils using atomic force microscopy*. Biochemical and biophysical research communications 303: 508-513 (2003);
- [39] Bowen, W.R., R.W. Lovitt, C.J. Wright, *Application of atomic force microscopy to the study of micromechanical properties of biological materials*. Biotechnology Letters 22: 893-903 (2000);

- [40] Hertz, H., *Über die Berührung Fester Elastischer Körper (On the Contact of Elastic Solids)*. J. Angew. Math. 92: 156-171 (1881);
- [41] Vinckier, A., G. Semenza, *Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy*. FEBS Letter 430: 12-16 (1998);
- [42] Dimitriadis, E. K., F. Horkay, J. Maresca, B. Kachar, R. Chadwick, *Determination of Elastic Moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope*. Biophysical Journal 82: 2798-2810 (2002);
- [43] Hassan, E., W. F. Heinz, M. D. Antonik, N. P. D'Costa, S. Nageswaran, c. Schoenenberger, J. H. Hon, *Relative Microelastic Mapping of Living Cells by Atomic Force Microscopy*. Biophysical Journal 74: 1564-1578 (1998);
- [44] Featherstone, H. J., V. J. Franklin, J. Sansom, *Feline corneal sequestrum: laboratory analysis of ocular samples from 12 cats*. Veterinary ophthalmology 7: 229-238 (2004);
- [45] Stafford, M.J., *The histology and biology of the lens*. Association of Optometrists 23-29 (2001);
- [46] Liu, Z., B. Wang, X. Xu, C. Wang, *A study for accommodating the human crystalline lens by finite element simulation*. Computerized Medical Imaging and Graphics 30: 371-376 (2006);
- [47] Chien, C. M., T.Huang, R. A. Schachar, *Analysis of human crystalline lens accommodation*. Journal of Biomechanics 39: 672-680 (2006);
- [48] Dubbelman, M., G. L. Van der Heijde, H. A. Weeber, G. F. J. M. Vrensen, *Changes in the internal structure of the human crystalline lens with age and accommodation*. Vision Research 43: 2363-2375 (2003);
- [49] Abolmaali, A., R.A. Schachar, T. Le, *Sensitivity study of human crystalline lens accommodation*. Computer Methods and Programs in Biomedicine 85: 77-90 (2007);

- [50] Donaldson, P., A. Grey, B. Merriman-Smith, A. Sisley, C. Soeller, M. Cannell, M. Jacobs, *Functional Imaging: New views on lens structure and function*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 31: 890-895 (2004);
- [51] Dick, H. B., S. E. Aliyeva, F. Hengerer, *Effect of trypan blue on the elasticity of the human anterior lens capsule*. Journal of Cataract & Refractive Surgery 34: 1367-1373 (2008);
- [52] Kuszak, J.R., R.K. Zoltoski, C. Sivertson, *Fibre cell organization in crystalline lenses*. Experimental Eye Research 78: 673-687 (2004);
- [53] Bito, L. Z., C. V. Harding, *Patterns of cellular organization and cell division in the epithelium of the cultured lens*. Experimental Eye Research 4: 146-161 (1965);
- [54] Kuszak, J. R., C. A. Ennesser, J. Umlas, M. S. Macsai-Kaplan, R. S. Weinstein, *The ultrastructure of fiber cells in primate lenses: A model for studying membrane senescence*. Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research 100: 60-74 (1988);
- [55] Kelley, P., Y. Sado, M. Duncan, *Collagen IV in the developing lens capsule*. Matrix Biology 21: 415-423 (2002);
- [56] Cai, F., S. B. Zhang, Y. Zheng, L. X. Xie, Z. X. Zhou, D. S. C. Lam, *A Study of the Human Anterior Lens Capsule (ALC) by Atomic Force Microscopy (AFM) and Scanning Electron Microscopy (SEM)*. Invest Ophthalmol Vis Sci 46: 4213 (2005);
- [57] Katon, T., Y. Watanabe, K. Nakayasu, A. Kanai, Y. Yajima, *The Ultrastructure of lens Capsule Abnormalities in Alport's Syndrome*. Jpn Ophthalmol 42: 401-405 (1998);
- [58] Silver, F.H. *Biological Materials: Structure, Mechanical Properties And Modeling of Soft Tissues*. NYU Press, New York 164-195 (1987);
- [59] Krag, S., T. T Andreassen., *Mechanical properties of the human lens capsule*. Progress in Retinal and Eye Research 22: 749-767 (2003);

- [60] Haddad, A., G. Bennett, *Synthesis of lens capsule and plasma membrane glycoproteins by lens epithelial cells and fibers in the rat*. American Journal of Anatomy 183 (3): 212 - 225 (1988);
- [61] Bhat, S., *The Ocular Lens Epithelium*. Bioscience Reports 21(4): 537-563 (2002);
- [62] Candia, O. A. , L. J. Alvarez, *Fluid transport phenomena in ocular epithelia*. Progress in Retinal and Eye Research 27: 197-212(2008);
- [63] Goodenough, D., J. Dick II, J. Lyons, *Lens mMetabolic cCooperation: A study of mouse lens transport and permeability visualized with freeze-substitution autoradiography and electron microscopy*. The Journal of Cell Biology 86: 576-589 (1980);
- [64] Bassnett, S., J. Kuszak, L. Reinisch, H. Brown, D. Beebe, *Intercellular communication between epithelial and fiber cells of eye lens*. Journal of Cell Science 107: 799-811 (1994);
- [65] Sal nosso de cada dia, *VEJA.com: Veja na Sala de Aula*. Disponível em: <http://veja.abril.com.br/saladeaula/020708/>. Acessado em 15 de outubro de 2009;
- [66] Kuszak, J. R., *The development of lens sutures*. Progress in Retinal and Eye Research. 14: 567-591 (1995);
- [67] Kuszak, J.R., R.K. Zoltoski, C.E. Tiedemann, *Development of lens sutures*. Int. J. Dev. Biol. 48: 889-902 (2004);
- [68] Medina-Gutiérrez, C., C. Frausto-Reyes, J. L. Quintanar-Stephano, R. Sato-Berrú, O. Barbosa-García, *Study of the protein distribution in the pig lens cross section by Raman spectroscopy*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 60: 1573-1577 (2004);
- [69] Andley, U. P. *Crystallins in the eye - Function and pathology*. Progress in Retinal and Eye Research 26: 78-98 (2007);
- [70] Lang, G. *Ophthalmology - A Short Text Book*. Thieme Stuttgart, New York (2000);

- [71] Praveen, M. R., A. R. Vasavada, B. Ghodadra, H. F. Edelhauser, *Corneal Endothelial Morphologic Features in Cataract and Clear Lens in an Indian Population*. American Journal of Ophthalmology 144: 914-920.e1 (2007);
- [72] Chen, K. H., W. T. Cheng, M. J. Li, M. Yang, S. Y. Lin, *Calcification of senile cataractous lens determined by Fourier transform infrared (FTIR) and Raman Microspectroscopies*. Journal of Microscopy 219: 36-41 (2005);
- [73] Chen, L. , Y. Chang, J. C. Kuo, R. Rajagopal, D. T. Azar, *Metaanalysis of cataract development after phakic intraocular lens surgery*. Journal of Cataract & Refractive Surgery 34: 1181-1200 (2008);
- [74] Ciaralli, L., R. Giordano, S. Contantini, A. Sepe, F. Cruciani, A. Moramarco, B. Antonelli, C. Balacco-Gabrielli, *Element concentrations and cataract: an experimental animal model*. J. Trace Elements. Med. Biol. 14: 205-209 (2001);
- [75] Cruciani, F., A. Moramarco, B. Antonelli, R. Mollo, C. Balacco-Gabrieli, S. Costantini, L. Ciaralli, R. Giordano, A. Sepe, E. Amore, M. Valeri, *Evaluation of five elements in lenses and aqueous humour of experimental rabbits after induced opacity*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 18: 141-147 (2004);
- [76] Barnett, K. C., S. M. Crispin, *Feline Ophthalmology: An Atlas & Text*. (1997);
- [77] Featherstone, H. J., J. Sansom, *Feline corneal sequestra: a review of 64 cases (80 eyes) from 1993 to 2000*. Veterinary ophthalmology 7: 213-227 (2004);
- [78] Glaze, M. *Congenital and Hereditary ocular abnormalities in cats*. Topics in Companion Animal Medicine 20: 74-82 (2005);
- [79] Jena, B. P. , J. K. H. Hörber , L. Wilson, P. T. Matsudaira, *Methods in Cell Biology - Volume 68 - Atomic Force Microscopy in Cell Biology*. Academic Press, 1st edition (2002);
- [80] Florin, E. L., Radmacher, B. Fleck, H. E. Gaub, *Atomic force microscope with magnetic force modulation*. Rev. Sci. Instrum. 65: 639-643 (1993);

- [81] O'Shea, S. J., M. E. Welland, and J. B. Pethica, *Atomic force microscopy of local compliance at solid-liquid interfaces*. Chem. Phys. Lett. 223: 336-340 (1994);
- [82] Han, W., S. M. Lindsay, T. Jing, *A magnetically driven oscillating probe microscope for operation in liquids*. Applied Physics Letter 69: 4111-4113 (1996)
- [83] Ziebarth, N. M., E. P. Wojcikiewicz, F. Manns, V. T. Moy, J. Parel, *Atomic force microscopy measurements of lens elasticity in monkey eyes*. Molecular Vision 13: 504-510 (2007);
- [84] Horcas, I., R. Fernandez, J.M. Gomez-Rodriguez, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, A. M. Baro, Rev. Sci. Instrum. 78: 013705 (2007).