

# Determinação da concentração de elementos traço em catarata de cães portadores do diabetes melito pela técnica de Fluorescência de Raios X em Energia Dispersiva

M. B. P. Braga<sup>1</sup>; M. Scapin<sup>2</sup>; A. M. V. Safatle<sup>3</sup>; P. S. M. Barros<sup>3</sup>, A. Antunes<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Universidade de São Paulo, 05508-270, São Paulo-SP, Brasil*

<sup>2</sup>*Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 05508-000, São Paulo-SP, Brasil*

<sup>3</sup>*Laboratório de Investigação em Oftalmologia Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 05508-270, São Paulo-SP, Brasil*

<sup>4</sup>*Instituto de Física, Universidade de Uberlândia, 38400-902, Uberlândia-MG, Brasil*

*(Recebido em 26 de junho de 2011; aceito em 26 de agosto de 2011)*

---

Os elementos traço são requeridos em pequenas concentrações, mas imprescindíveis nos processos bioquímicos, imunológicos e fisiológicos. Contudo, pode haver associação entre os níveis de elementos traço e a presença de diversas doenças. O metabolismo celular do paciente diabético é suscetível ao aumento do estresse oxidativo, em razão da cronicidade e instabilidade dos níveis glicêmicos. Particularmente, a hiperglicemia crônica pode promover a formação da catarata nestes pacientes. Desta forma, a avaliação da concentração dos elementos traço é importante na investigação dos processos patológicos, visando mecanismos de prevenção. Neste trabalho, foram determinadas as concentrações dos elementos traço ferro, cobre e zinco em cataratas de cães diabéticos pela técnica de fluorescência de raios x por dispersão em energia (EDXRF).

Palavras-chave: Catarata diabética, elementos traço, fluorescência de raios X.

Trace elements are required in minor concentrations, but indispensable in biochemical, immunological and physiological processes. Nevertheless, there might be some association between levels of trace elements and the presence of some disorders. The cellular metabolism of diabetic patient is susceptible to increased oxidative stress, due to the chronicity and instability of blood glucose levels. Particularly, chronic hyperglycemia may induce the cataracts formation in these patients. Thus, measuring the concentration of trace elements is important in the investigation of pathological processes, aiming at prevention mechanisms. In this study we determined the iron, copper and zinc contents of cataractous lenses of diabetic dogs using the energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF).

Keywords: Diabetic cataract, trace elements, X-ray fluorescence.

---

## 1. INTRODUÇÃO

A catarata é a doença ocular mais prevalente no mundo. Há uma estimativa de que cerca de 30 a 45 milhões de pessoas no mundo estejam acometidas pela cegueira, no qual a catarata corresponde cerca de 45% [1]. A etiologia é multifatorial podendo ser de origem congênita, hereditária ou causada por doença sistêmica, toxicidade, trauma ou idade [2].

O diabetes melito (DM) é uma das mais freqüentes doenças endócrinas que afetam cães de meia- idade e idosos [3]. Constitui-se pela deficiência relativa e absoluta da produção de insulina. O DM pode ser classificado como tipo 1 e 2 baseando-se na classificação estabelecida para humanos. O DM tipo 1 é caracterizado pela destruição ou perda de células  $\beta$  e o DM tipo 2 é caracterizado pela resistência insulínica ou produção inadequada de insulina [4].

Na espécie canina, a catarata é principal manifestação ocular do DM [5] e geralmente está associada com desenvolvimento rápido, bilateral e simétrico em razão das alterações das vias metabólicas da lente [6]. Estudo recente indicou que cerca de 50% dos cães diabéticos desenvolveram catarata com aproximadamente seis meses após o diagnóstico e 80% com aproximadamente 16 meses do diagnóstico [7]. A incidência da catarata em cães é muito alta

porque a maioria destes animais apresenta uma hiperglicemia significativa a despeito da terapia insulínica, e progridem rapidamente para cegueira [4].

Os elementos químicos são responsáveis por inúmeras atividades bioquímicas, imunológicas e fisiológicas do organismo. Contudo, podem-se associar os níveis de elementos traço em fluídos corpóreos ou tecidos à presença de várias doenças [8]. O papel dos elementos traço na formação da catarata tem sido investigado [9-13] devido às alterações na concentração desses elementos em opacificações lenticulares, tanto em catarata de origem senil como em cataratas diabéticas confirmando a hipótese que alguns elementos traço atuam ativamente na formação da catarata [14].

O ferro é pouco afetado pelo DM, entretanto seu papel na formação de radical livre, e o aumento do estresse oxidativo no diabete, podem ocasionar complicações a pacientes diabéticos [15]. Os radicais livres são fundamentais para a patofisiologia de inúmeras doenças e o ferro funcionando como um catalisador é o maior atuante nestes processos. Especificamente no olho, os radicais livres participam na injúria ao tecido, o que contribui para muitas doenças, incluindo a formação da catarata, doenças corneanas, degeneração retiniana, retinopatia diabética, glaucoma e entre outras [16].

O cobre é essencial para a manutenção das funções fisiológicas normais [10], atuando na atividade de numerosas enzimas, como citocromo oxidase, superóxido dismutase, uricase [17]. O cobre pode potencializar a peroxidação lipídica e as alterações oxidativas [15], sendo um dos fatores mais importantes na cataractogênese, que podem gerar derivados que atuam como mensageiros tóxicos no estresse oxidativo, e mudanças na composição lipídica da lente conduzem a aumento da permeabilidade da membrana e conseqüentemente a opacificação lenticular [18].

O zinco tem influência no metabolismo celular através de vários mecanismos e tem papel importante na manutenção normal da função visual. Os níveis de zinco podem também influenciar na ação insulínica e desenvolvimento do DM, bem como nas complicações crônicas [19]. Concentrações elevadas de zinco levam a oxidação de grupos sulfídricos, o que pode potencializar a formação da catarata, em virtude do aumento na permeabilidade da membrana celular [9].

Os elementos traço podem ser componentes fundamentais de enzimas antioxidantes, co-fatores em importantes processos enzimáticos no metabolismo do lipídio e da glicose, ou no potencial pro-oxidante. O DM tipo 1 e 2 são acompanhados por alterações na absorção e excreção de micronutrientes. O maior efeito desta alteração é o declínio da capacidade do organismo em combater a produção de radicais livres [15].

A fluorescência de raios X (XRF) é uma técnica analítica para avaliação dos elementos traço em diversos materiais biológicos, químicos ou geológicos [20]. Em tecidos biológicos, através da fluorescência de raios X é possível determinar as alterações dos elementos de tecidos em estágios patológicos, em razão do caráter multielementar, não destrutiva, rápida análise, alta sensibilidade, determinação simultânea de elementos  $Z \geq 15$  [11]. O objetivo deste estudo foi estabelecer as alterações dos elementos traço ferro, cobre e zinco em amostras de catarata de cães diabéticos utilizando a técnica de fluorescência de raios X em energia dispersiva (XRF).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi analisado um grupo de lentes com catarata de cães diabéticos (GCAT) de diversas raças que foram submetidos à cirurgia de catarata pelo Serviço de Oftalmologia, do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Inicialmente, realizou-se o exame oftalmológico completo, citam-se os seguintes exames: teste da acuidade visual, teste de Schirmer, teste com corantes vitais, tonometria, biomicroscopia e oftalmoscopia.

Com intuito de comparar as alterações dos elementos ferro, cobre e zinco, foi estabelecido um grupo de lentes normais através de enucleação do bulbo ocular de cadáveres de cães, sem quaisquer alterações oculares ou sistêmicas, para formar o grupo controle (GCO).

As amostras coletadas foram imediatamente armazenadas em refrigeração a  $-40^{\circ}\text{C}$ , em seguida passaram pelo processo de liofilização (Terroni LC) a  $-55^{\circ}\text{C}$  a baixa pressão (aproximadamente  $-780\text{ mmHg}$ ) por 48 horas. Subsequentemente, foram trituradas e analisadas por fluorescência de raios X em energia dispersiva (EDXRF 720, Shimadzu, Japão).

As análises experimentais foram conduzidas no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo, Brasil. O equipamento consiste de um tubo de raios X equipado com uma fonte de raios X (Rh) operando a 50 kV e 100  $\mu\text{A}$  e com tempo de aquisição típico para cada elemento de 100 segundos. As características das radiações emitidas pelo elemento da amostra foram obtidas por um detector de Si (Li). Foi realizada a análise do material de referência certificada, fígado de bovino (NIST-SRM 1577b) para aferir os limites de detecção.

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinar a significância entre os dados obtidos e aplicado o teste *pos hoc* de Tukey para a verificação da diferença significativa. Para os testes admitimos o nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, a possibilidade da determinação dos elementos ferro, cobre e zinco em catarata de cães diabéticos, foi examinado com o propósito de correlacionar a participação destes elementos químicos na formação da catarata diabética em cães.

Nos pacientes diabéticos, vários órgãos vitais são afetados pela instabilidade crônica da glicemia e o aumento do estresse oxidativo. Os elementos traço estão envolvidos em um processo complexo de desenvolvimento das complicações secundárias do DM [15]. Diversos estudos [9-14] avaliaram a concentração de elementos traço em lentes de humanos diabéticos, entretanto, este estudo é pioneiro na avaliação da concentração dos elementos traço ferro, cobre e zinco em cataratas de cães diabéticos.

Os resultados obtidos no grupo controle (GCO) e grupo catarata diabética (GCAT) estão apresentados nas tabelas 1 a 3. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Tabela 1: Concentração elementar ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) das amostras analisadas do grupo controle (GCO).

Amostra	Fe	Cu	Zn
1	11,50	26,43	43,31
2	13,82	28,91	43,60
3	8,98	25,15	19,86
4	8,95	25,33	43,76
5	13,13	27,45	41,78
6	11,30	28,42	31,29
<b>Média</b>	<b>11,3</b>	<b>26,95</b>	<b>37,3</b>
<b>Desvio Padrão</b>	2,03	1,574	9,78

Tabela 2: Concentração elementar ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) das amostras analisadas do grupo catarata diabética (GCAT).

Amostra	Fe	Cu	Zn
1	6,36	22,25	39,04
2	9,36	20,79	32,54
3	6,42	20,64	40,24
4	9,97	24,79	39,28
5	9,86	23,93	40,22
6	15,54	20,73	35,29
7	7,45	20,53	41,82
8	16,63	23,24	36,60
<b>Média</b>	<b>10,2</b>	<b>22,11</b>	<b>38,1</b>
<b>Desvio Padrão</b>	3,92	1,69	3,08

A concentração de Fe determinada é apresentada na figura 1. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

O ferro, um metal de transição, atua como um catalisador na formação de radicais livres, sendo assim pode potencialmente contribuir na patogenia de inúmeras doenças, incluindo a catarata [16]. Estudos em lentes de humanos diabéticos apontaram um aumento da concentração de Fe, indicando a relação deste elemento com a opacificação lenticular, porém não houve diferença significativa [12,13]. Em cataratas de ratos diabéticos experimentalmente induzidos, obteve-se um aumento significativo da concentração deste elemento [11]. A literatura apresenta dados controversos aos obtidos neste trabalho, o qual apresentou uma diminuição dos níveis de Fe na catarata de cães diabéticos. Este resultado é consistente com a hipótese obtida em um estudo que avaliou a concentração de ferritina na fibra da lente de cães, uma importante proteína que permite o armazenamento do Fe. A concentração determinada nas fibras lenticulares foi menor em relação às células epiteliais da lente. Adicionado a isto, houve uma diminuição da concentração de ferritina com o avanço da idade, tal diminuição, particularmente em lentes mais velhas (potencial reduzido), pode estar relacionado com a habilidade limitada em armazenar o Fe de forma segura e assim proteger a lente contra os danos do estresse oxidativo [21].

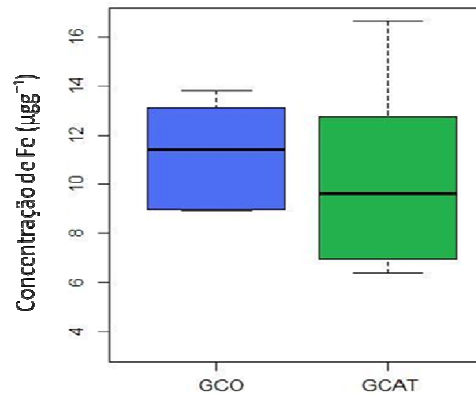


Figura 1: Representação gráfica com os valores das concentrações de Fe para o grupo controle (GCO) e grupo catarata diabética (GCAT).

Os valores de concentração de Cu podem ser visualizados na figura 2. A concentração de Cu diferiu significativamente entre os grupos, demonstrando uma diminuição da concentração deste elemento na catarata diabética.

Um estudo com lentes de humanos diabéticos demonstrou um aumento significativo na concentração de Cu [10], este resultado foi confirmado na literatura, sugerindo a influência do Cu na opacificação lenticular em pacientes portadores de DM [13]. Tem sido bem estabelecido o papel do Cu na formação de radicais livres e na progressão da opacificação lenticular pela peroxidação de proteínas, lipídeos e outras estruturas da membrana celular [10]. Entretanto, o Cu é essencial na regulação da atividade enzimática [13], atuando na defesa antioxidante [22]. Contudo, um declínio nos níveis de Cu está relacionado com o aumento no estresse oxidativo [15]. Nossos resultados reforçam a hipótese de que uma diminuição da concentração de Cu constitui um fator de risco para a formação da catarata diabética.

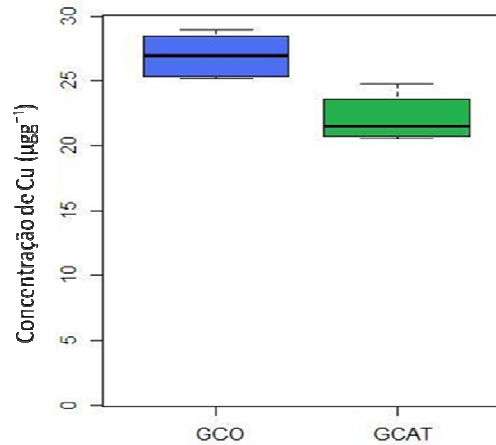


Figura 2: Representação gráfica com os valores das concentrações de Cu para o grupo controle (GCO) e grupo catarata diabética (GCAT).

A concentração de Zn encontrada é apresentada na figura 3. Não houve diferença com significância estatística entre todos os grupos. Porém houve um aumento na concentração de Zn na catarata diabética neste estudo. Os valores médios obtidos foram  $37,3 \pm 9,78 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $38,1 \pm 3,08 \mu\text{g g}^{-1}$  para os GCO e GCAT respectivamente. Estudos com cataratas diabéticas e não diabéticas em humanos [12, 13] obtiveram resultado semelhante. Outro estudo apontou um aumento significativo da concentração de Zn em catarata diabética senil comparada com catarata senil não diabética de humanos [14]. O Zn está envolvido na proteção contra a oxidação dos grupos sulfídricos e formação de radicais livres [23] inibindo os metais de transição, competindo com o Fe e Cu nos sítios de ligação [15]. Embora, um aumento nos níveis deste elemento possa gerar a oxidação e agregação de proteínas insolúveis na lente e aumento da permeabilidade vascular, que são processos inerentes a cataractogênese [14].

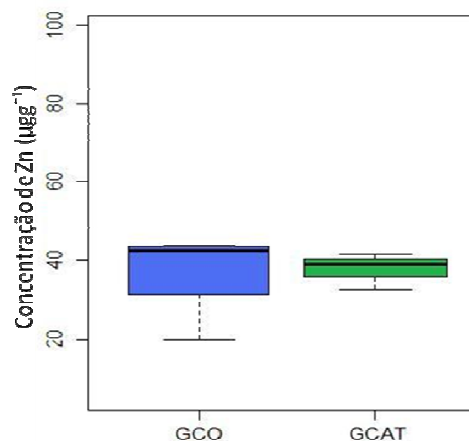


Figura 3: Representação gráfica com os valores das concentrações de Zn para o grupo controle (GCO) e grupo catarata diabética (GCAT).

#### 4. CONCLUSÃO

Este estudo apontou uma diminuição na concentração de ferro e cobre, que pode promover a exacerbação de agentes oxidantes no organismo. Considera-se que a elevação da concentração de zinco nas amostras de cataratas diabéticas potencialize o processo de caractogênese. Os resultados obtidos reforçam a hipótese que os elementos traço ferro, cobre e zinco tem um papel importante no estresse oxidativo, contribuindo para o desenvolvimento da catarata diabética em cães. Foi desenvolvida uma metodologia para uso da técnica de Fluorescência de Raios X para

análise tecidos oculares. O estudo demonstrou a utilização satisfatória da técnica e a contribuição do estudo dos elementos traço em amostras de catarata diabética na espécie canina.

1. EKINCI, N.; ASTAM, N.; SAHIN, Y. Qualitative and quantitative analysis of the cataract using EDXRF. *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*. 72:783-787 (2002).
2. GLOVER, T. D.; CONSTANTINESCU, G. M. Surgery for cataracts. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 27:1143-1173 (1997).
3. FLEEMAN, L. M.; RAND, J. S. Management of canine diabetes. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 31: 855-880 (2001).
4. FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Canine diabetes mellitus. In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, 3. ed. Philadelphia: Elsevier, 2004. p. 486-538.
5. CULLEN, C. L.; WEBB, A. Ocular manifestations of systemic diseases. In: GELATT, K. N. *Veterinary Ophthalmology*, 4 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. p. 1509-1511.
6. DAVIDSON, M. G.; NELMS, S. R. Diseases of the canine lens and cataract formation. In: GELATT, K. N. *Veterinary Ophthalmology*, 4 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. p. 859-887.
7. BEAM, S.; CORREA, M. T.; DAVIDSON, M. G. A retrospective-cohort study on the development of cataracts in dogs with diabetes mellitus: 200 cases. *Veterinary Ophthalmology*. 2:169-172 (1999).
8. ZUCCHI, O. L. A. D.; FACCIOLI, L. H.; NOMIZO, A.; MOREIRA, S.; SÁ-NUNES, A.; BOLZONI, R. M. F.; SANTOS, L. L.; SALVADOR, M. J. SRTXRF analysis of trace elements on inflammatory immune response. *Micronutrients and Health Research*. 15:293-307 (2008).
9. SRIVASTAVA, V. K.; VARSHNEY, N.; PANDEY, D. C. Role of trace elements in senile cataract. *Acta Ophthalmologica*. 70:839-841 (1992).
10. LIN, J. Pathophysiology of cataracts: cooper ion and peroxidation in diabetes. *Japanese Journal Ophthalmology*. 41:130-137 (1997).
11. CEKIC, O.; BARDAK, Y. Lenticular calcium, magnesium, and iron levels in diabetic rats and verapamil effect. *Ophthalmic Research*. 30:107-112 (1998).
12. DAWCZYNSKI, J.; BLUM, M.; WINNEFELD, K.; STROBEL, J. Increased content of zinc and iron in human cataractous lenses. *Biological Trace Elements Research*. 90:15-23 (2002).
13. AYDIN, E.; CUMURCU, T.; OZUGURLU, F.; OZURT, H.; SAHINOGLU, S.; MENDIL, D.; HASDEMIR, E. Levels of iron, zinc, and cooper in aqueous humor, lens, and serum in nondiabetic and diabetic patients. *Biological Trace Elements Research*. 108:3-41 (2005).
14. GUNDUZ, G.; GUNDUZ, F.; YUCEL, I.; SENTURK, U. K. Levels of zinc and magnesium in senile and diabetic senile cataractous lenses. *Biological Trace Element Research*. 95:107-112 (2003).
15. THOMPSON, K. H.; GODIN, D. V. Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes. *Nutrition Research*. 15:1377-1410 (1995).
16. GORALSKA, M.; FERRELL, J.; HARNED, J.; LALL, M.; NAGAR, S.; FLEISHER, L. N.; MCGAHAN, M. C. Iron metabolism in the eye: a review. *Experimental Eye Research*. 88: 1-12 (2009).
17. COOK, C. S.; MCGAHAN, M. C. Cooper concentration in cornea, iris, normal, and cataractous lens and intraocular fluids of vertebrates. *Current Eye Research*. 5:69-76 (1986).
18. WILLIAMS, D. L. Oxidative stress and the eye. *Veterinary of North Clinics: Small Animal Practice*. 38:179-192 (2008).
19. GRAHN, B. H.; PATTERSON, P. G.; GOTTSCHALL-PASS, K. T., ZHANG, Z. Zinc and the eye. *Journal of American College of Nutrition*. 20:106-118 (2001).
20. ZUCCHI, O. L. A. D.; FACCIOLI, L. H.; NOMIZO, A.; MOREIRA, S.; SÁ-NUNES, A.; BOLZONI, R. M. F.; SANTOS, L. L.; SALVADOR, M. J. SRTXRF analysis of trace elements on inflammatory immune response. *Micronutrients and Health Research*. 15:293-307 (2008).
21. GORALSKA, M.; FLEISHER, L. N.; MCGAHAN, M. C. Ferritin H- and L-chains in fiber cell canine and human lens of different ages. *Investigate Ophthalmology & Visual Science*. 48:3968-3975 (2007).
22. STRAIN, J. J. Disturbances of micronutrients and antioxidants status in diabetes. *Proceedings of Nutrition Society*. 50:501-604 (1991).
23. BENTLEY, P. J.; CHIN, B.; GRUBB, B. Some observations on the zinc metabolism of the rabbits lens. *Experimental Eye Research*. 38:467-507 (1984).