

*Lilian Midori Tomiyoshi*

***Influência do Envelhecimento sobre os Mecanismos  
Secretórios e Anti-oxidantes da Glândula Lacrimal***

***Orientador: Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha***

**DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA, OTORRINOLARINGOLOGIA E  
CIRURGIA CABEÇA E PESCOÇO**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meu irmão, meu marido e minhas filhas.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha, pelo tempo disponibilizado para me guiar nesse projeto.

Às minhas amigas Carola e Carol, por terem me acompanhado com paciência e me ensinado tudo que sei hoje. E por terem participação fundamental na realização dos meus experimentos.

Aos meus amigos Elísio e Leonardo, por compartilhar as dúvidas e os acertos.

Aos meus pais Alice e Luiz, por tudo.

Ao meu irmão Márcio pela força e pelas sugestões.

Ao meu marido Raul, pela paciência. E que paciência.

À minha filha Laís e à minha filha que ainda vai nascer, pelo amor incondicional. Delas e meu.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ach: Acetilcolina

ADP: Adenosina di-fosfato

ATP: Adenosina tri-fosfato

°C: Graus Celsius

C: Grupo controle

Ca<sup>+</sup>: Cálcio

CETEA: Comissão de ética em experimentação animal

CI: Citologia de Impressão

CL<sup>-</sup>: Cloro

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etileno-diamino-tetra acético

EGF: Epidermal Growth Factor

EUA: Estados Unidos da América

GL: Glândula lacrimal

GSH: glutathiona reduzida

GTP: Trifosfato de guanosina

GDP: guanosina difosfato inativa

HE: Hematoxilina-eosina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrogênio

MDA: Ácido malonaldeído

n: número de amostras ou animais utilizados por experimento

O<sub>2</sub>: Oxigênio

p: probabilidade associada à ocorrência da hipótese nula de um valor tão extremo quanto o valor mais extremo observado

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Espécies reativas de Oxigênio

PCR: Reação em cadeia da polimerase

SO: Superfície ocular

SOD: Superóxido dismutase

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

**Tabela 1.** Comparação entre os parâmetros estruturais e bioquímicos da GL entre os ratos velhos e controles (dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão). \*  $P < 0.05$ .

**Figura 1.** Foto ilustrativa da similaridade estrutural da glândula lacrimal entre ratos controles (A,B) e velhos (C,D). As GL foram retiradas, congeladas, fixadas e coradas com HE. As imagens são digitais com aumento de 100X (A,C) e 400x (B,D).

**Figura 2.** Representação microfotográfica da citologia de impressão da córnea de ratos controles (A,B) e velhos (C,D) ( $n = 8/\text{grupo}$ ). Grau de 0 a 3 foram dados para cada amostra de maneira mascarada, considerando o formato da célula, tamanho do núcleo e presença de muco. Os dados foram analisados pelo teste de Fisher e as diferenças foram consideradas significantes ( $P=0.032$ ).

**Figura 3.** Foto ilustrativa com autofluorescência para lipofuccina mostrando aumento de apoptose celular no grupo dos velhos (B), em relação ao controle (A).

**Figura 4.** Microscopia eletrônica com aumento de 4x (A,C) e 8x (B,D) no grupo controle (A, B) e dos velhos (C,D), demonstrando aumento de vesículas secretórias desestruturadas no grupo dos velhos.

**Gráfico 1.** Expressão da syntaxina na GL de ratos. Os valores encontram-se em unidades arbitrárias, e a diferença foi considerada significativa (\* $p < 0,05$ ).

**Gráfico 2.** Expressão das proteínas Rab 27b, Vamp e Rab 3b dos grupos controle e velhos. A expressão foi quantificada por RT-PCR.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
a. Olho seco.....	1
b. Envelhecimento.....	3
c. Estresse oxidativo.....	4
d. Sistema de transporte vesicular.....	6
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	11
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	12
a. Modelos animais.....	12
b. Teste de Schirmer e citologia de impressão.....	12
c. Análise da glândula lacrimal.....	13
d. Análise estrutural.....	13
e. Dosagem de acetilcolina e peroxidase.....	14
f. Dosagem de peroxidação lipídica e GSH.....	14
g. Identificação de Vamp-2 e syntaxina.....	15
h. Western Blotting.....	17
i. Análise estatística.....	19
<b>4. RESULTADOS</b> .....	20
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	31
<b>7. SUMMARY</b> .....	32
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	33

## RESUMO

O envelhecimento é responsável por alterações funcionais e estruturais na glândula lacrimal, incluindo o acúmulo de radicais livres, levando a danos em proteínas, lipídios e DNA em vários tecidos. O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito do envelhecimento na estrutura e nos mecanismos secretórios da glândula lacrimal, entre eles a expressão de proteínas das famílias Rab e SNARE, e elementos relacionados a mecanismos anti-oxidantes. Foram utilizados 10 ratos Wistar machos de 24 meses e 10 ratos Wistar machos de 02 meses. Foi comparada a secreção lacrimal e citologia de impressão da córnea. As glândulas lacrimais foram retiradas e submetidas à comparação estrutural e morfológica, à análise da expressão de peroxidase, vitamina E e MDA. A análise da expressão de proteínas da família Rab e SNARE foi realizada por RT-PCR. No grupo de ratos velhos, houve aumento do peso do animal ( $p=0,043$ ) e do peso da glândula lacrimal ( $p=0,0079$ ), porém quando ajustados para proporção (peso da glândula/peso do animal) não houve diferença estatística ( $p=0,2222$ ). A citologia de impressão demonstrou maior metaplasia na córnea dos velhos ( $p=0,0320$ ). Em relação aos marcadores de estresse oxidativo, houve aumento de MDA ( $p=0,0571$ ) e diminuição de vitamina E ( $p=0,0159$ ) na glândula lacrimal dos velhos. A expressão do RNAm de Rab 27b e Rab 3b foi confirmada nesse tecido e estão diminuídas com o envelhecimento ( $p<0,05$ ), mas não há diferença na expressão gênica da Vamp. Mecanismos secretórios e anti-oxidantes alterados pelo envelhecimento demonstrados nesse estudo podem ajudar a explicar distúrbios lacrimais e da superfície ocular. Essas informações podem ajudar a propor novas medidas terapêuticas para o olho seco relacionado à senilidade.

## **1. INTRODUÇÃO**

O olho e seus anexos passam, como todos os órgãos das várias formas de vida, pelo processo de senescência ou envelhecimento. Esse processo na superfície ocular e glândula lacrimal vem sendo extensivamente estudado nas últimas décadas, porém novas perspectivas precisam ser exploradas frente a mecanismos de função e doença recém-descobertos e a importância dessas estruturas para a boa visão e qualidade de vida dos idosos.

### **A. OLHO SECO**

Olho seco é definido como uma alteração do filme lacrimal por deficiência na produção de lágrimas ou evaporação excessiva, causando danos à superfície ocular interpalpebral. O olho seco pode estar associado a sintomas de desconforto ocular, e representa um grupo heterogêneo de condições relacionadas a anormalidades do filme lacrimal de múltiplas causas como deficiência aquosa, anormalidades das camadas de mucina e/ou lipídica ou disfunções palpebrais (Lemp 1995).

Muito se discute se o olho seco no idoso é um evento normal e esperado da senilidade (Rocha, Alves et al. 2008) ou está associado a exposição crônica a fatores de risco ou ao mal controle de doenças crônico-degenerativas e portanto poderia ser incluído num quadro sindrômico ou uma doença por si só e portanto evitável ou tratável.

Estudos epidemiológicos têm sido realizados na tentativa de delinear características populacionais e fatores de risco associados aos sinais e sintomas de olho seco. Apesar da maioria dos estudos se limitar a população senil, a prevalência de olho seco é bastante variável dependendo do desenho

do estudo, parâmetros medidos, limites estabelecidos para normalidade e da população analisada. Alguns fatores de risco associam-se a maior ocorrência de sintomas de desconforto ocular relacionados ao olho seco como história de artrite reumatóide, tireiodopatias, diabetes, hábito de fumar, uso de lentes de contato e algumas medicações como antidepressivos, diuréticos e anti-histamínicos (Lemp 1995; Schein, Munoz et al. 1997; McCarty 1998; Moss, Klein et al. 2000; Schaumberg, Sullivan et al. 2002; Rocha, Alves et al. 2008).

Durante toda a vida, as glândulas lacrimais são responsáveis pela secreção da fração aquosa do filme lacrimal carreando além de água, diversos nutrientes e eletrólitos que umidificam e mantêm o metabolismo da superfície ocular, garantindo qualidade óptica, conforto e proteção. A lágrima contém diversos agentes responsáveis pela vigilância imunológica da superfície ocular tais como imunoglobulinas, lactoferrinas e lisozimas e fatores de crescimento responsáveis por estímulos de diferenciação e crescimento celular imprescindíveis à renovação epitelial e ao reparo de lesões oculares, inclusive intervenções programadas como na cirurgia de catarata (Wilson 1991).

Diversas doenças degenerativas podem acometer as glândulas lacrimais determinando perda funcional, alterações de superfície ocular e manifestações de olho seco. Alterações auto imunes como a Síndrome de Sjögren (Sullivan DA 1997; Toda I 1999), alterações de caráter indeterminado presentes em doenças crônicas como o diabetes (Ramos-Remus, Suarez-Almazor et al. 1994; Seifart and Stempel 1994) e insuficiência de hormônios sexuais (Sullivan DA 1997; Sullivan 1999); (Bromberg and Welch 1985); (Schein, Munoz et al. 1997) figuram como principais mecanismos de acometimento das glândulas lacrimais.

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas alterações relacionadas ao olho seco ainda não estão inteiramente elucidados. A deficiência lacrimal causa falha na renovação epitelial da córnea, podendo levar a defeitos epiteliais que de ponteados podem chegar a áreas geográficas e aprofundar com a erosão estromal e criar um ambiente inflamatório onde células epiteliais e linfócitos são estimulados a produzir e secretar de diversas citocinas. Níveis aumentados de citocinas no filme lacrimal combinados a redução de promotores de crescimento como EGF e retinol afetam a diferenciação epitelial na superfície ocular e conseqüentemente induzem hiperplasia, aumento da atividade mitótica de células inflamatórias, expressão diminuída de moléculas de proteção como a mucina, diminuição de células calciformes e aumento de fibroblastos e matriz extra-celular (Rocha EM 1998; Pflugfelder SC 1999; Solomon A 2001); (Zoukhri and Kublin 2002).

#### **b. ENVELHECIMENTO**

O Instituto Nacional de Envelhecimento do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos define envelhecimento como sendo “um processo natural e complexo que envolve todas as moléculas, células e órgãos do corpo”. É, portanto, um processo natural e universal durante o qual ocorrem acúmulo de alterações deletérias nas células e tecidos, aumentando a chance de doenças e de morte (Harman 1994).

Como já mencionado, a glândula lacrimal também sofre efeitos do envelhecimento. Estudos recentes mostram que a glândula lacrimal de idosos apresenta, histopatologicamente, fibrose periductal, atrofia acinar e aumento de infiltrados inflamatórios (Machinami 1995; Obata, Yamamoto et al. 1995).

Funcionalmente, há diminuição da habilidade das células acinares de sintetizar e secretar proteínas que compõe o filme lacrimal, entre as quais lipocalina, lisozima, peroxidase, lactoferrina, betalisina e imunoglobulinas secretórias (Adeghate 2003).

Outro processo que ocorre durante o envelhecimento é o acúmulo de radicais livres (Holbrook 2000). Esses radicais livres, por conterem elétrons livres ocupando orbitais (Halliwell 2006), têm tendência a reagirem com outros radicais livres, formando agentes oxidantes e nitrizantes, que são responsáveis pelos danos em proteínas, lipídios e ao DNA (Halliwell and Whiteman 2004). Esses danos podem contribuir para o aparecimento do câncer em animais, e para o envelhecimento propriamente dito.

### **c. ESTRESSE OXIDATIVO**

Um conceito atual diz que “um estado crônico de estresse oxidativo existe nas células de organismos aeróbicos mesmo sob condições fisiológicas devido ao equilíbrio de mecanismos pró e antioxidantes. O dano oxidativo aumenta com o envelhecimento, resultando em uma perda progressiva da eficiência da função de inúmeros processos celulares”. (Halliwell 2006).

Nesse contexto, existem as chamadas espécies reativas, que podem ou não serem radicais livres (Halliwell and Whiteman 2004). Essas podem ser de oxigênio (ROS), de nitrogênio ou de cloro. A ROS mais importante é o radical livre ânion superóxido, que é a primeira produzida na célula.

Apesar de necessário para a vida, a fim de evitar danos, o organismo atua para minimizar os níveis de oxigênio ou deter a sua conversão em ROS. Para diminuir os níveis de oxigênio, os animais aeróbicos usam a cadeia de

transporte de elétrons mitocondrial. Para deter a conversão em ROS, são utilizados a enzima superóxido dismutase (SOD), que converte o oxigênio livre em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , e as enzimas que removem o  $H_2O_2$ , como as catalases, a glutatona peroxidase e a peroxiredoxinas (Halliwell 2006).

A glutatona peroxidase (GSH) é um antioxidante solúvel sintetizado endogenamente no fígado e a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo pró-oxidante, combatendo os radicais livres e protegendo as células contra a apoptose (Nicotera and Orrenius 1986).

A GSH existe em 2 formas: reduzida (sulfidril) e oxidada ( dissulfito), e é mantida in vivo sob a forma reduzida pela ação da enzima glutatona redutase. Como a maior parte da GSH reduzida compreende os grupos sulfidril não protéicos, a quantificação de tióis solúveis em ácido é empregada na quantificação de níveis teciduais de GSH.

Os olhos por exemplo, funcionam com tecidos expostos a níveis de 8 a 20 vezes menor do que o disponível em condições atmosféricas ao nível do mar e o aumento pode ser responsável pela ocorrência de doenças como catarata e glaucoma (Shui YB 2009).

Sob estresse oxidativo, as células reagem aumentando o nível intracelular de cálcio e proliferando, podendo levar à fibrose tecidual e conseqüentemente à morte celular. Da mesma forma, o deslocamento de cálcio é fundamental para um outro processo marcadamente reduzido com o envelhecimento que é a secreção lacrimal ou exocitose de elementos que vão compor o filme lacrimal (Dartt, Hodges et al. 1998; Sundermeier, Matthews et al. 2002; Rios, Horikawa et al. 2005).

Um aumento no estresse oxidativo também afeta a glândula lacrimal, levando a um acúmulo progressivo de grânulos de lipofuccina intracelulares. A lipofuccina é constituída de proteínas cross-linked e altamente oxidadas. É um produto insolúvel, não degradável por enzimas lisossomais e o seu acúmulo diminui a vida celular (Rios 2004).

#### **d. SISTEMA DE TRANSPORTE VESICULAR**

O sistema de transporte vesicular é um conjunto de sub-sistemas responsável pela formação, amadurecimento, fusão e secreção de vesículas.

Vesículas são compartimentos envoltos por uma bicamada lipídica que armazenam, transportam, digerem e secretam moléculas, organelas e corpos estranhos às células. São formadas a partir de membranas pré-existentes, se destacando delas, e servindo para organização celular e como câmaras para reações químicas (Bonifacino and Glick 2004).

Para garantir que o transporte para as membranas seja efetuado de maneira correta, as vesículas necessitam de uma alta especificidade para garantir sua fusão à membrana-alvo específica. Essa fusão ocorre após a despolimerização das proteínas envoltórias e envolve um conjunto fixo de proteínas controlando a sinalização e assegurando que o alvo certo seja alcançado, ativando o processo de fusão.

Aliadas a essas enzimas sinalizadoras estão proteínas receptoras incorporadas nas membranas-alvo que garantem a fusão ao alvo correto. Este reconhecimento envolve basicamente duas classes de proteínas: SNAREs e GTPases sinalizadoras denominadas Rabs.

## **SNARES**

As SNAREs (soluble NSF attachment receptor) constituem uma família de proteínas que desempenham um papel central na especificidade do transporte vesicular e na catálise do processo de fusão. A despolimerização das proteínas envoltórias (coat proteins) das vesículas permite que uma proteína denominada v-SNARE (vesicle SNARE), antes coberta pela proteína envoltória, seja descoberta, podendo executar seu papel e se associar à membrana-alvo correspondente. Esta proteína é incorporada à vesícula na própria organela de origem. A membrana de cada organela ou membrana-alvo possui uma ou mais proteínas integrais de membrana, denominadas t-SNAREs (target SNARE), junto com uma proteína de fusão denominada SNAP25. Essas proteínas agem de forma conjunta, efetuando uma ligação específica à v-SNARE correspondente. A especificidade com que cada SNARE interage determina a especificidade do ancoramento e da fusão de cada vesícula. Dessa maneira, as SNAREs especificam a identidade de seus compartimentos e governam a troca de materiais durante o transporte vesicular (Bonifacino and Glick 2004).

Uma proteína crucial chamada de NSF (“N-ethylmaleide-Sensitive Factor”) circula entre as membranas e o citosol e catalisa as reações de dissociação do complexo estável. Essa enzima é uma ATPase que usa ATP para solubilizar e refazer a conformação de proteínas desnaturadas. Similarmente, a NSF usa ATP para desenrolar as hélices enroladas (coiled-coil) entre os domínios helicoidais das SNAREs associadas, usando alguns adaptadores protéicos para se ligarem as SNAREs e separá-las.

Os requerimentos para a dissociação do complexo estável trans-SNARE podem ajudar a explicar porque as vesículas não se fundem indiscriminadamente na célula. Se uma t-SNARE estiver sempre ativa na membrana-alvo, qualquer outra membrana que contivesse a v-SNARE correspondente se fundiria àquela membrana sempre que as duas fizessem contato. No entanto a necessidade de uma reativação controlada de SNAREs pela NSF permite que a célula controle quando e onde as membranas irão se fundir.

### **Rab**

As proteínas Rabs constituem um papel importante na especificidade do transporte vesicular. Elas são GTPases monoméricas e possuem uma distribuição característica nas membranas celulares e estão presentes na superfície citosólica de todas as organelas.

As proteínas Rabs circulam entre a membrana e o citosol. Quando ligadas ao GDP elas se encontram em sua forma inativa no citosol e quando ligadas ao GTP se encontram em sua forma ativa acopladas à membrana. Como as proteínas Rabs se ligam e hidrolisam GTP se considera que o ciclo de hidrólise e ligação do GTP está diretamente ligado ao ancoramento vesicular. Especificamente, uma enzima chamada GDI catalisa a troca do GDP, ligado ao Rab citosólico, por GTP, causando uma mudança conformacional na Rab que permite que ela se ligue a uma proteína de membrana em uma vesícula de transporte. Após a fusão vesicular, o GTP ligado à Rab é então hidrolisado sofrendo novamente uma mudança conformacional e é liberado no citosol para que o ciclo se repita novamente. Portanto, a velocidade de fusão

vesicular é controlada pela quantidade absoluta de Rab-GTP, que é regulada por proteínas não identificadas.

Uma vez em sua forma ligada ao GTP e ancorada em uma membrana lipídica, a proteína Rab se liga a outras proteínas denominadas efetivantes de Rabs (Rab Effectors) que facilitam o processo de ancoramento. A fusão vesicular é então limitada à região aonde esse complexo reside, apesar de as t-SNAREs estarem distribuídas uniformemente por toda a membrana. Apesar das proteínas Rab e seus efetivantes utilizarem mecanismos largamente diferentes, ambas ajudam a concentrar vesículas próximas aos locais onde ocorrerá a fusão e ativam a liberação de proteínas de controle de SNAREs. Dessa maneira, as proteínas Rabs aceleram o processo de combinação de duas SNAREs de membranas diferentes (Bonifacino and Glick 2004).

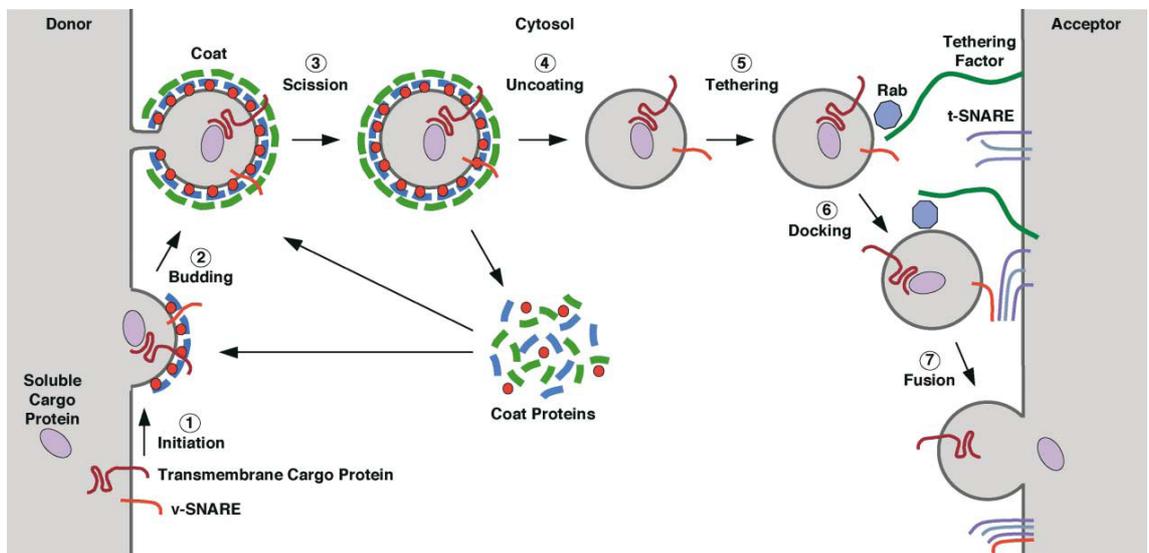


Figura 1. Etapas de formação e fusão vesicular

(1) Início. Os componentes proximais da membrana-coat (azul) são recrutados para o compartimento do doador através da ligação a uma GTPase (vermelho).

- (2) Budding. Os componentes são adicionados e polimerizados à membrana distal (verde).
- (3) Cisão. Ocorre o corte entre a vesícula e o compartimento do doador.
- (4) Uncoating. A vesícula perde o seu casaco devido aos vários eventos, incluindo inativação da GTPase, bem como a ação de enzimas uncoating. Em seguida, as proteínas são reciclados para outras rodadas de acoplamento.
- (5) A vesícula desloca-se para o compartimento aceitador, eventualmente guiado pelo citoesqueleto, e se amarram ao compartimento do aceitador pela combinação de um GTP vinculada a uma Rab.
- (6) Acostagem. Formação do complexo "trans-snare".
- (7) Este complexo "trans-snare" promove a fusão das vesículas. A carga é transferida para o compartimento aceitador.

A hipótese desse estudo é que em ratos, o envelhecimento produz redução na expressão de elementos da família Rab e SNARE, já anteriormente descritos nesses tecidos (Bonifacino and Glick 2004), e que isso ocorre em paralelo com alterações anteriormente descritas na função e mecanismos de sinalização anteriormente descritos (Rocha EM 2000; Rocha and Carvalho 2003).

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo geral desse estudo é compreender mecanismos de secreção lacrimal e de proteção ao dano oxidativo com o envelhecimento.

Os objetivos específicos são:

- a.** A comparação funcional da secreção lacrimal entre modelos animais jovens e idosos através de Teste de Schirmer e estrutural da superfície ocular pela citologia de impressão;
- b.** A avaliação e comparação do estresse oxidativo entre modelos animais jovens e idosos através da quantificação de peroxidase e MDA;
- c.** A comparação morfológica das glândulas lacrimais através de microscopia eletrônica;
- d.** A investigação da expressão da família Rab e SNARE em GL (RNAm e proteínas) e seu impacto no envelhecimento de ratos.

### **3. MATERIAL E MÉTODO**

#### **a. Modelos animais**

Para o estudo foram utilizados 10 ratos Wistar machos de 24 meses e 10 ratos Wistar machos de 02 meses fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto – SP, Brasil. Os animais foram acondicionados em caixas com 4 animais, com ração e água ad libitum.

Os animais foram submetidos à eutanásia com xilazina 15mg/kg e ketamina 150 mg/kg, por via intraperitoneal e o peso corporal e da glândula lacrimal registrados. Tecidos oculares e da glândula lacrimal foram submetidos à análise bioquímica e histológica.

Os tecidos destinados à imunistoquímica foram congelados em nitrogênio líquido e os tecidos destinados a estudos de westernblotting foram homogeneizados em tampão de extração.

Os protocolos de estudo e o projeto seguem as diretrizes da Association of Research in Vision and Ophthalmology e foram submetidos à apreciação pelo comitê de experimentação animal (CETEA) da FMRP-USP.

#### **b. Teste de Schirmer e Citologia de Impressão**

A secreção lacrimal foi medida do olho direito dos ratos de ambos os grupos usando um teste de Schirmer modificado (Ophthalmos, São Paulo, Brasil), com a utilização de uma tira do papel de teste de Schirmer de 1 mm de largura por 20 mm de comprimento, posicionado no fundo de saco conjuntival por 5 minutos.

Para a citologia de impressão, amostras de células do epitélio corneano foram obtidas da superfície ocular usando papel de filtro 0.45 µm (Millipore, Billerica, MA, USA) após anestesia. As amostras foram coletadas da mesma área (temporal) e transferidas para lâminas, fixadas com etanol 70%, ácido acético glacial e formol e fixados com ácido periódico de Schiff (PAS) e coloração de hematoxilina. Estágios do epitélio foram avaliados de maneira mascarada, e as células epiteliais foram classificadas em 4 estágios: estágio 0 (para morfologia normal) a estágio 3 (metaplasia escamosa) (Modulo CM et al 2009).

#### **c. Análise da Glândula lacrimal**

Após a medida do peso corpóreo, os ratos foram eutanizados com excesso de anestesia intraperitoneal. As GL foram coletadas e diretamente fixadas em composto de OCT (Sakura Fine Tek Inc., Torrance, CA, USA) e congeladas em nitrogênio líquido ou homogeneizadas no tampão (50mM tris – pH: 7.5, 150mM NaCl, 0.1% triton e inibidor de protease coquetel III (calbiochem) com o politron (Virsonic, USA). As amostras foram congeladas até a realização dos procedimentos experimentais.

#### **d. Análise estrutural**

Lâminas de parafina contendo 10 a 14 secções da glândula lacrimal de ambos os grupos foram submetidas a coloração por hematoxilina/eosina (HE) (5 amostras por animal, n = 5/grupo). Fotos digitais foram obtidas das lâminas coradas por HE ou sem coloração para registro dos corpúsculos citoplasmáticos de lipofucsina, que apresentam auto-fluorescência (Nikon

Eclipse E800, Nikon USA, Melville, NY), a estrutura e área dos ácidos foram comparadas de maneira mascarada, em atenção para detectar diferenças entre ambos os grupos.

#### **e. Dosagem de acetilcolina e peroxidase**

Acetilcolina e peroxidase foram medidas na GL de ambos os grupos (n=5/grupo), usando o acetylcholine assay kit (Amplex Red; Molecular Probes) (Zoukhri and Kublin 2001).

Para medir Ach, 0.1ml do homogenado de tecido foram preparados em duplicata em 96 well microplates. Foi utilizada uma curva padrão de Ach para cada experimento. Em cada poço foi adicionado 0.1ml de tampão (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) contendo 0.2M do reagente Amplex Red, 2 U/ml horseradish peroxidase, 0.2 U/ml choline oxidase, e 10 U/ml de ach foi adicionado. Após a incubação, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Beckman, DU 640, USA) ) usando um comprimento de onda de 530 nm.

Para a medida de peroxidase, 0.1 ml de tampão e 0.01 ml do tecido homogenado foi colocado em duplicata em 96 well microplates. Em cada uma foi adicionado 0.1 ml de solução tampão contendo 0.2 M do reagente Amplex Red e 0.2 M de peróxido de hidrogênio. Após a incubação, a absorbância foi determinada como descrito acima. A atividade de peroxidase foi expressa em porcentagem da absorbância obtida contra uma curva padrão H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### **f. Dosagem de peroxidação lipídica e GSH**

A peroxidação lipídica foi determinada pela presença de malonaldeído usando o teste do ácido tiobarbitúrico. Amostras de 200ul do homogenado de

GL de ambos os grupos foram desproteinizadas com 20% de ácido tricloroacético, agitado por 30 min, centrifugados a 5000 g e o sobrenadante foi exposto a 0.7% do ácido tiobarbitúrico e aquecido por 95° C por 45 min. Após esfriar, a absorbância foi lida em 530 nm no espectrofotômetro Spectra Max 250 (Esterbauer H, Cheeseman KH).

O GSH foi determinado pela reação entre homogenado de GL e 5.5” dithiobis (ácido 2 nitrobenzóico). Após a normalização dos níveis de proteínas das amostras e incubação por 5 minutos, a absorbância foi lida a 412 nm no espectrofotômetro (Beckman, DU 640, USA).

#### ***g. Identificação de Vamp-2 e syntaxina-3***

Foi realizado o RT-PCR para identificar os componentes da família SNARE responsáveis pelo controle da secreção lacrimal. Entre os que foram expressos na GL de ratos, Vamp-2 e syntaxina 3 foram comparados entre os ratos velhos e controles. O RNAm da RPS-29 apresentou uma seqüência que identifica a subunidade 29 da proteína ribossomal expressa de forma regular e proporcional em células eucaróticas e foi usado portanto como controle e normalizador de conteúdo. O RNA total foi purificado através da GL e amostras de ilhotas pancreáticas (controle positivo) usando Trizol (Invitrogen, San Diego, CA, USA) e tratados com deoxiribonuclease I (Gibco/BRL) para eliminar a contaminação com DNA. Amostras resultantes do RNA foram quantificadas por espectrofotômetro a 260 nm e avaliadas em formoldeído 6,6% e gel de agarose 1% (Gibco/BRL) para assegurar a integridade do RNA. A transcriptase reversa, oligo dT priming e o Advantage RT-for-PCR kit do Clontech Laboratories Inc. (Palo Alto, CA, USA) foram utilizados para a transcrição do cDNA.

O cDNA resultante foi amplificado com o PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando 15 unidades de Taq DNA polimerase (Gibco/BRL), 3 nM de cada dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Invitrogen), tampão PCR (Tris -HCl 60 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, NH<sub>4</sub> SO<sub>4</sub>pH10 15 mM) (Invitrogen), e 10 mM de 5' and 3' primers correspondendo a Vamp 2 de rato, Snap 23 de rato, syntaxina de rato e o RPS-29 de rato, obtidos pelas referencias das seqüências do banco de genes e sintetizados pela Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA).

O programa PCR para Vamp 2 E syntaxina foi igual e envolveu as seguintes etapas: 32 ciclos de desnaturação por 1 min a 94°C, aquecimento por 1min a 57°C, extensão por 1,5 min a 72°C e a máxima conclusão por 7 minutos a 72°C. Após a amplificação, os fragmentos de cDNA foram analisados através de gel de agarose a 1% contendo um marcador de peso molecular de DNA de 100 pares de base (Gibco/BRL) e corado a seguir com brometo de etídio para confirmar o antecipado e 202 bp para Vamp 2, Snap 23, sitaxinae RPS-29, respectivamente.

Preliminarmente foram realizados ensaios para assegurar os produtos na escala linear. Em todo o procedimento do PCR, foram realizados controles positivos e negativos de cDNA paralelos, em tubos separados. Controles positivos para RNAm de Vamp-2 e syntaxina incluíram cDNA preparados a partir de ilhotas pancreáticas de ratos. Controles negativos incluíram amostras sem transcriptase reversa ou sem amostras de cDNA.

Os resultados de marcação de bandas no gel pelo brometo de etídio foram registrados em Gel Doc (Bio-Rad). As membranas foram escaneadas,

convertidas para fotos digitais e analisadas pela Scion Image Analysis Software (Scion Corp, Frederick, MD, USA).

## H. Western Blotting

Para avaliar a expressão protéica de elementos da família Rab e Snare em homogeneizados de glândula lacrimal e comparar entre amostras de velhos e controles, os seguintes procedimentos de *Western blotting* foram realizados:

Géis de poliacrilamida foram preparados em duas fases. A fase de empilhamento, disposta superiormente, foi preparada contendo 4,2 ml de água desionizada, 1,25 ml de poliacrilamida a 40%, 25 µl de Temed, 270 µl de APS a 10% e 5,6 ml de solução tampão de empilhamento com pH de 6,7 composta de EDTA a 4mM, SDS a 10%, 50 mM de Trisma base, diluídos em água desionizada completando 1 litro. A fase de resolução, disposta inferiormente, composta de acrilamida nas concentrações de 10%, 1,9 ml de água desionizada, 1,8 ml de glicerol, 4,2 ml de acrilamida 40%, Temed e APS nos volumes descritos acima e 9 ml da solução tampão de resolução com pH de 8,9 composta de EDTA a 4mM, SDS a 2%, 750 mM de Trisma base e água desionizada para completar 2 litros.

Alíquotas com concentrações protéicas semelhantes, normalizadas pelo método de Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951), (Jorge AG, et al Endocrine 2009), foram aplicadas nos géis SDS-PAGE em aparelho minigel (Miniprotean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA) em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos (BioRad, Hercules, CA, EUA) em tampão de corrida composto por 200mM de Trisma base, 1,52 de glicina, 7,18 mM de EDTA, SDS a 0,4%, diluídos em água desionizada. Foi adicionado ainda 50 µl

de beta-mercapto-etanol (BioRad, Hercules, CA, EUA) para aumentar a permeabilidade a proteínas de alto peso molecular. A voltagem, inicialmente de 20 volts, foi sistematicamente ajustada para 100 volts a medida que as amostras passavam da fase de empilhamento para a fase de resolução, segundo o método já descrito (Carvalho, 1996).

Após a separação por eletroforese, as proteínas isoladas foram transferidas para membranas de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemanha), realizada durante 120 minutos à 120V em aparelho miniaturizado de transferência (BioRad Laboratories, Richmond, CA, EUA) em solução de transferência composta por 25 mM de Trisma base, 192 mM de glicina, metanol a 20%, SDS a 0,02% e água desionizada completando o volume de 2 litros, conforme descrito anteriormente. As membranas foram então incubadas por duas horas em solução bloqueadora de soro-albumina bovina (BSA) 3%, para diminuir as ligações inespecíficas das proteínas contendo 0,3 g de BSA, 2 mg de azida sódica, Tris a 10 mM, NaCl a 150 mM e Tween 20 a 0,02% em 10 ml de água desionizada.

Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpos IgG policlonal de coelho, anti-NF- $\kappa$ B p65 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, EUA) na diluição 1:500 em solução BSA 1% semelhante a decrita acima, por 12 horas a 22 °C. As membranas foram reveladas por quimioluminescência (SuperSignal, Rockford, IL, EUA), ou iodo radioativo (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido). A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria depois de digitalizados por scanner HP Scanjet 3400C, e analisadas pela Scion Image Analysis Software (Scion Corp, Frederick, MD, USA).

#### **h. Análise estatística**

Dados foram expressos como média e erro padrão (média  $\pm$  erro padrão). Comparações foram feitas usando o teste Mann-Whitney U para dados contínuos e teste de Fisher para dados categóricos (Graphpad 5.0 software, Prisma, São Diego, CA,USA). Valores densitométricos foram expressos em porcentagem da média dos valores obtidos para o grupo controle, os quais foram definidos como 100% em cada ensaio experimental. O nível de significância usado foi  $P < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

### **Análise dos parâmetros bioquímicos e estruturais da glândula lacrimal**

O peso do corpo e o peso GL estão significativamente aumentadas no grupo dos velhos (tabela 1).

Os animais apresentaram níveis similares de Ach na GL, mas a peroxidase foi significativamente mais alta e o MDA apresentou tendência de maior nível na GL dos velhos. A dosagem de vitamina E na GL foi significativamente mais baixa no grupo dos velhos (tabela 1).

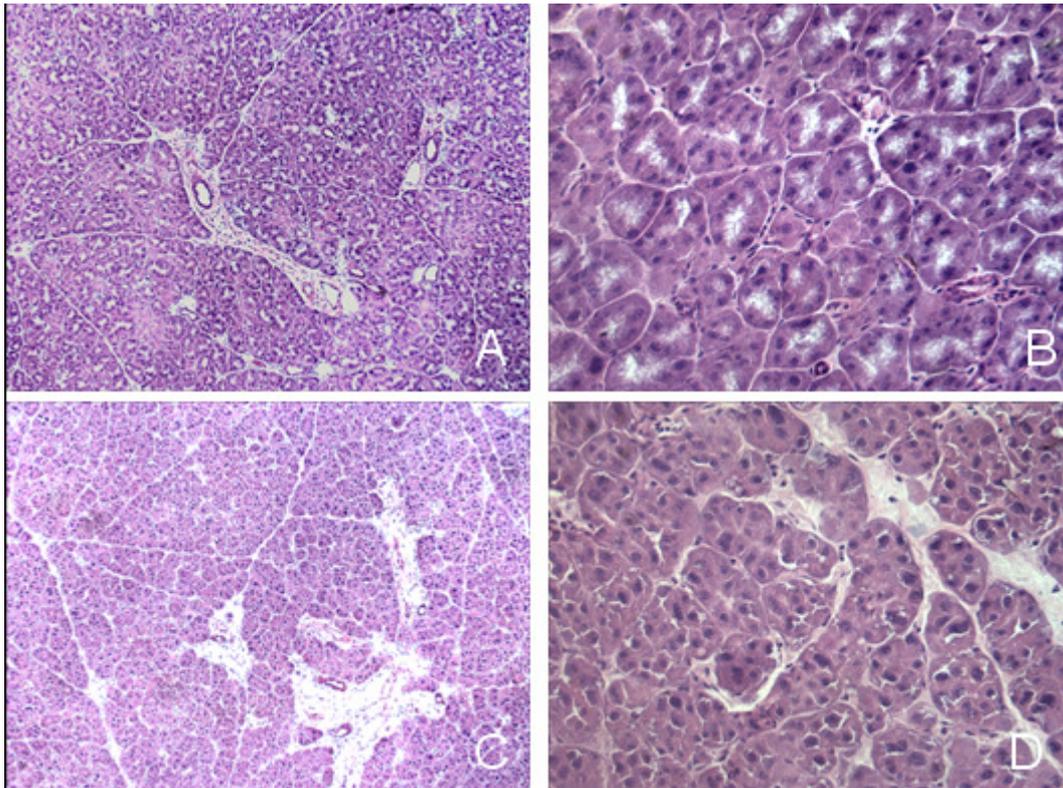
O Teste de Schirmer foi  $8.8 \pm 0.9695$  mm no grupo controle e  $7.286 \pm 1.375$  mm no grupo dos velhos ( $P=0.5145$ ).

**Tabela 1.** Comparação entre os parâmetros estruturais e bioquímicos da GL entre os ratos velhos e controles. (dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão). \*  $P < 0.05$ .

	Controle	Velhos	P
Peso do corpo g *	272.00 $\pm$ 11.576	551.67 $\pm$ 62.102	0.0043
Peso da GL mg *	108.60 $\pm$ 11.352	166.20 $\pm$ 10.259	0.0079
Peso da GL/peso do corpo	40.200 $\pm$ 4.386	29.800 $\pm$ 1.881	0.2222
MDA mmol/g	11.0 $\pm$ 0.8898	24.6 $\pm$ 1.6523	0.0571
Peroxidase % *	0.4185 $\pm$ 0.09112	0.75238 $\pm$ 0.02712	0.0379
Vitamina E uM *	4.9840 $\pm$ 0.50472	1.7850 $\pm$ 0.18423	0.0159
Ach $\mu$ M	0.00925 $\pm$ 0.0009	0.01200 $\pm$ 0.00012	0.0519

## Avaliação estrutural da GL

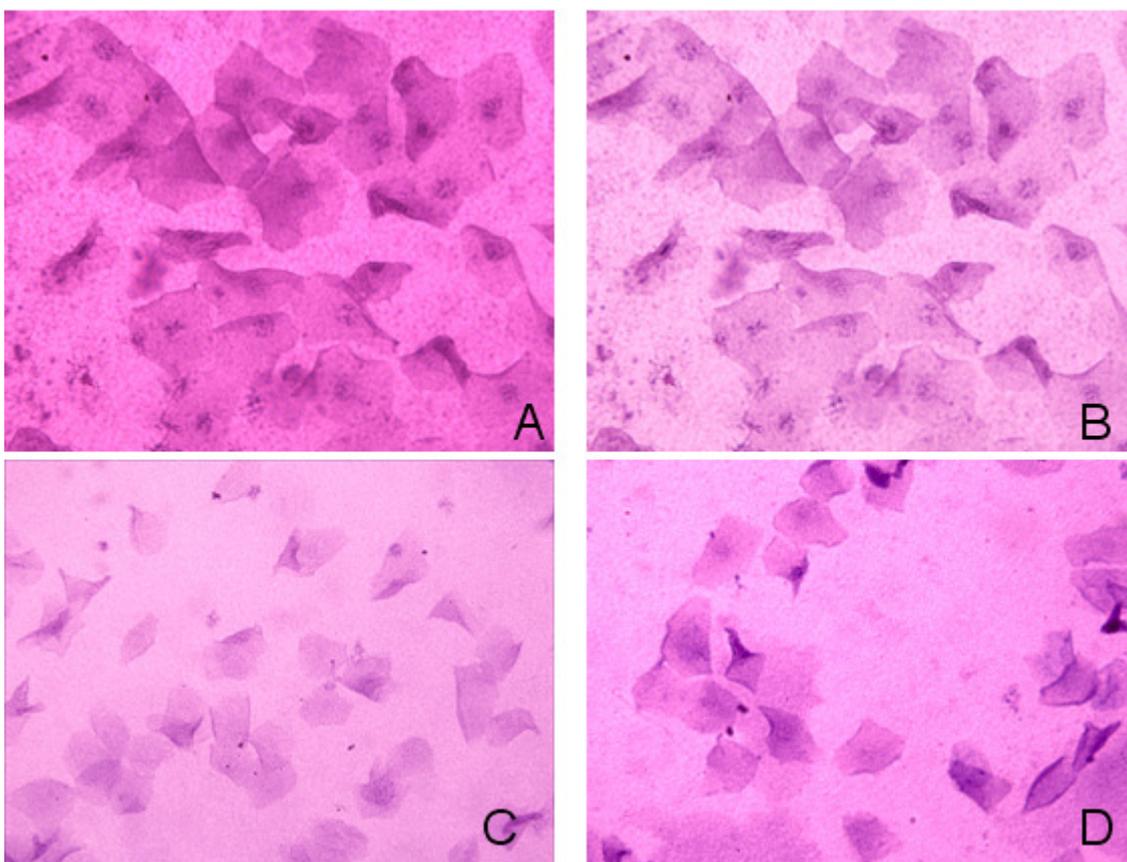
A avaliação estrutural da GL corados com hematoxilina/eosina não demonstrou diferenças entre o grupo controle e dos velhos.



**Figura 1.** Foto ilustrativa da similaridade estrutural da glândula lacrimal entre ratos controles (A,B) e velhos (C,D). As GL foram retiradas, congeladas, fixadas e coradas com HE. As imagens são digitais com aumento de 100X (A,C) e 400x (B,D).

## Avaliação do epitélio celular através da citologia de impressão

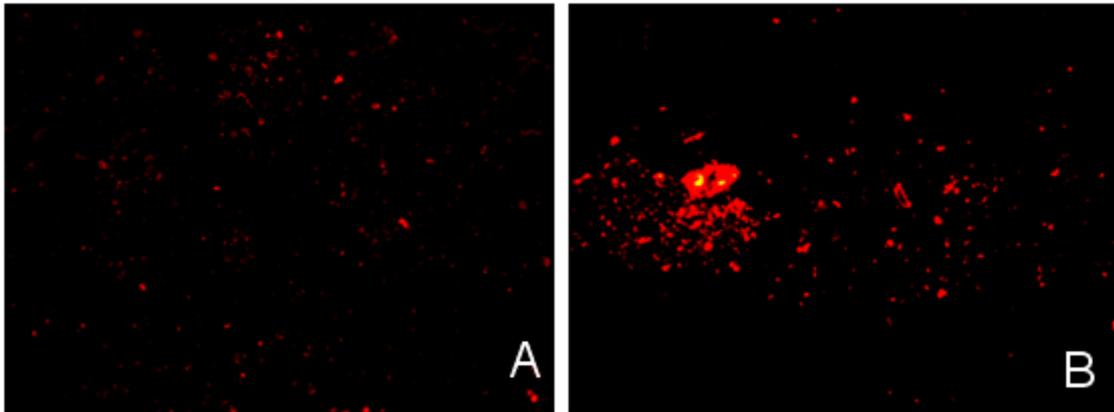
A citologia de impressão (CI) da córnea dos velhos apresentou alterações das células epiteliais, com queratinização metaplásica ( $P=0.032$ , teste de Fisher).



**Figura 2.** Representação microfotográfica da citologia de impressão da córnea de ratos controles (A,B) e velhos (C,D) ( $n = 8$ /grupo). Grau de 0 a 3 foram dados para cada amostra de maneira mascarada, considerando o formato da célula, tamanho do núcleo e presença de muco. Os dados foram analisados pelo teste de Fisher e as diferenças foram consideradas significantes ( $P=0.032$ ).

### Avaliação dos depósitos de lipofuscina

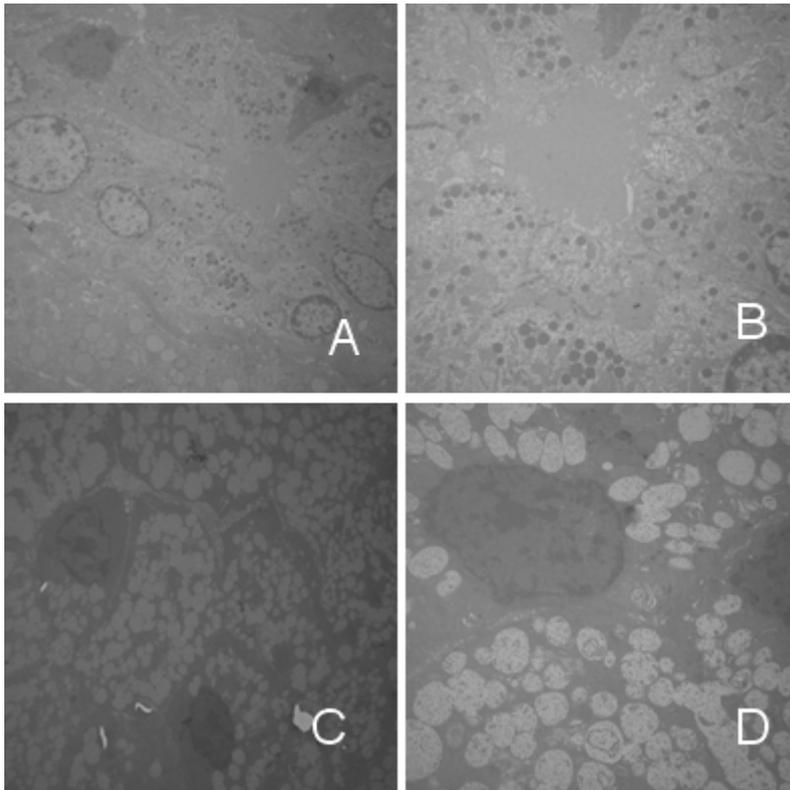
A avaliação da autofluorescência para lipofuscina demonstrou aumento do acúmulo de grânulos de lipofuscina no grupo dos velhos.



**Figura 3.** Foto ilustrativa com autofluorescência para lipofuscina mostrando aumento de apoptose celular no grupo dos velhos (B), em relação ao controle (A).

## **Análise da microscopia eletrônica**

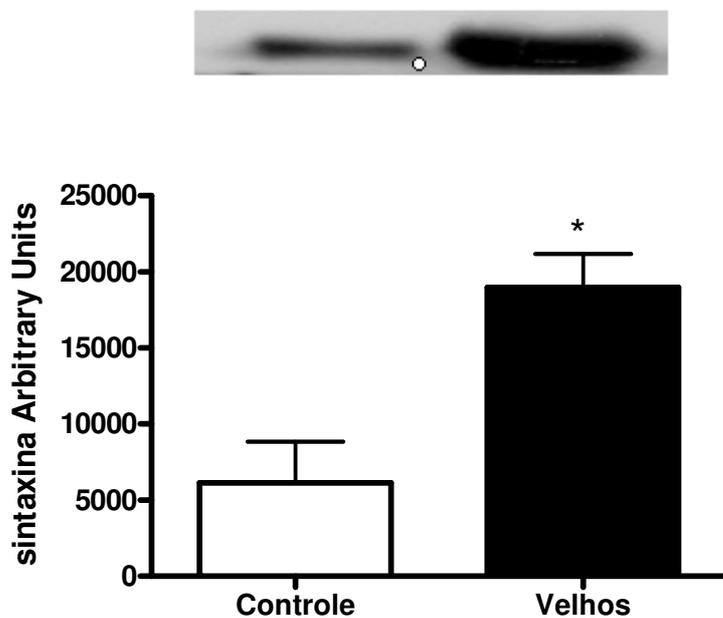
A análise da microscopia eletrônica demonstrou maior número de vesículas secretórias agrupadas e de conteúdo translúcido no grupo dos velhos.



**Figura 4.** Microscopia eletrônica com aumento de 4x (A,C) e 8x (B,D) no grupo controle (A, B) e dos velhos (C,D), demonstrando aumento de vesículas secretórias desestruturadas no grupo dos velhos.

## Avaliação do Western Blotting para sintaxina

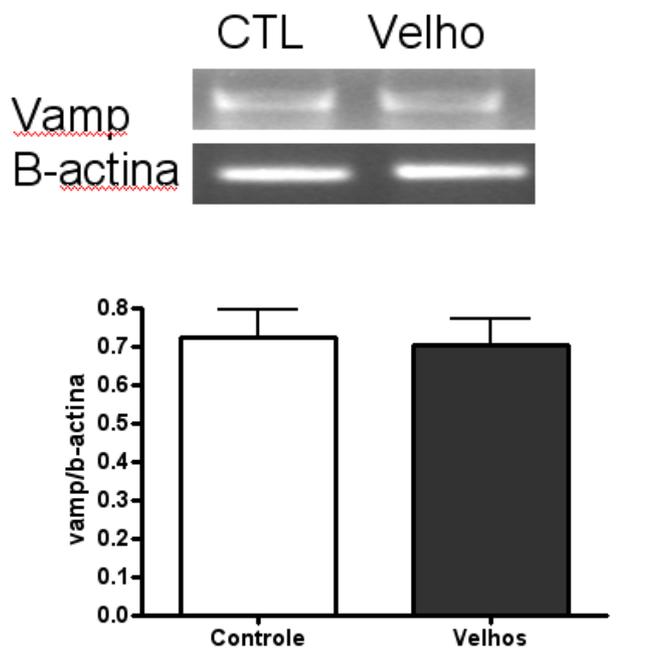
A avaliação do Western Blotting para sintaxina demonstrou aumento da expressão da proteína no grupo dos velhos.

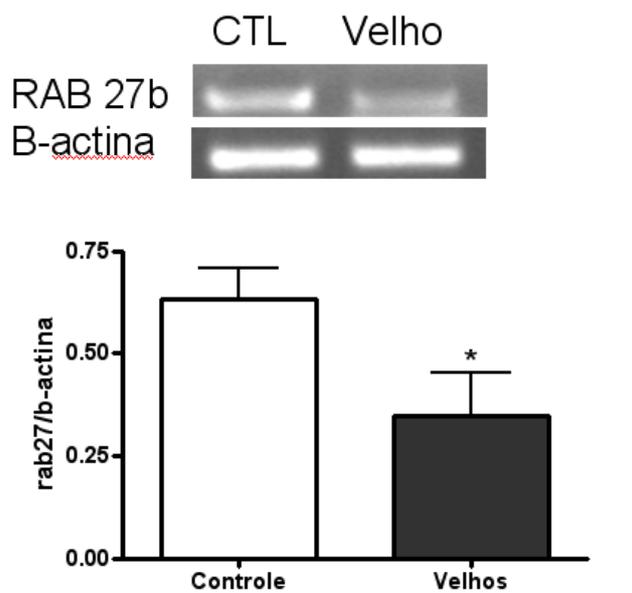
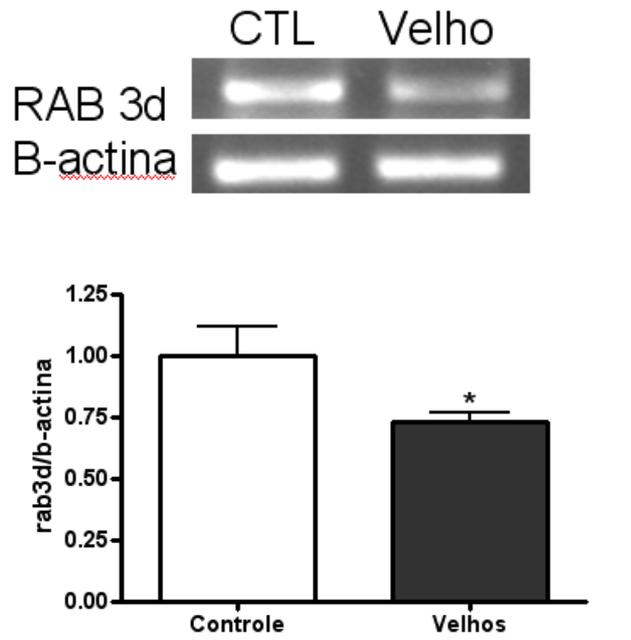


**Gráfico 1.** Expressão da sintaxina na GL de ratos. Os valores encontram-se em unidades arbitrárias, e a diferença foi considerada significativa (\* $p < 0,05$ ).

## Avaliação da expressão dos membros da família Rab e SNARE em GL

A avaliação da expressão das proteínas demonstrou diminuição das expressões de Rab 27b e Rab 3d nos grupos dos velhos ( $p < 0.005$ ), porém sem diferença na expressão da Vamp.





**Gráfico 2.** Expressão das proteínas Rab 27b, Vamp e Rab 3b dos grupos controle e velhos. A expressão foi quantificada por RT-PCR.

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo mostrou os elementos participantes no processo secretório que ocorrem na GL e avaliou os efeitos do envelhecimento em ratos.

Em relação aos achados histológicos da GL, estudos recentes demonstraram que a glândula lacrimal de idosos apresenta fibrose periductal, atrofia acinar e aumento de infiltrados inflamatórios (Machinami 1995; Obata, Yamamoto et al. 1995). No entanto, os achados deste estudo não conseguiram demonstrar estatisticamente uma diferença na estrutura da GL dos grupos de envelhecimento.

Em contrapartida, as análises da CI da córnea demonstraram aumento de metaplasia corneana no grupo dos velhos.

Durante o envelhecimento, consideramos que as células sofrem um estresse oxidativo (Halliwell 2006). Considerando que sob estresse oxidativo as células reagem proliferando, podendo levar à fibrose tecidual e conseqüentemente à morte celular, pudemos verificar que houve realmente um acúmulo progressivo de grânulos de lipofuccina intracelulares no grupo de envelhecimento. Sendo constituída de proteínas cross-linked e altamente oxidadas, a lipofuccina é um produto insolúvel, não degradável por enzimas lisossomais, e o seu acúmulo diminui a vida celular (Rios 2004), ou seja, há morte celular durante o envelhecimento da GL.

Outro processo que ocorre durante o envelhecimento é o acúmulo de radicais livres (Holbrook 2000), aumentando o processo de estresse oxidativo nas células. Podemos comprovar que no envelhecimento realmente ocorreu o acúmulo de alguns marcadores de estresse oxidativo nas células, tais como o

MDA e peroxidase, porém o primeiro não teve relevância estatística. Por outro lado, houve diminuição significativa dos níveis de vitamina E, um agente antioxidativo, podendo significar que seu consumo ainda está sendo utilizado para obter um equilíbrio intracelular.

Neste estudo, pudemos comprovar que em ratos o envelhecimento realmente está relacionado com a diminuição da expressão de RNAm de proteínas da família Rab e SNARE. Sendo essas proteínas parte integrante de um complexo sistema de transporte vesicular (Bonifacino and Glick 2004), podemos então inferir que no processo de envelhecimento há uma deficiência funcional e qualitativa na secreção de lágrimas e de seus constituintes.

## 6. CONCLUSÕES

**a.** Na comparação funcional da secreção lacrimal entre modelos animais jovens e idosos pudemos comprovar que no grupo de ratos velhos houve aumento do peso do animal ( $p=0,043$ ) e do peso da GL ( $p=0,0079$ ), porém quando ajustados para proporção (peso da glândula/peso do animal) não houve diferença estatística ( $p=0,2222$ ). O teste de Schirmer não evidenciou diferença significativa no volume de secreção ( $p=0,5145$ ). Em relação à análise da estrutura da superfície ocular, a citologia de impressão demonstrou aumento das células degradadas no grupo dos velhos, não significante estatisticamente ( $p=0,0320$ ).

**b.** Em relação aos marcadores de estresse oxidativo, houve aumento de MDA ( $p=0,0571$ ), diminuição de vitamina E ( $p=0,0159$ ), aumento da expressão de proteínas ( $p=0,0002$ ) e da peroxidase ( $p=0,0379$ ), porém a acetilcolina não foi significativa ( $p=0,0519$ ).

**c.** A microscopia eletrônica demonstrou que há um aumento de vesículas secretórias alteradas no envelhecimento.

**d.** A expressão do RNAm das famílias Rab 27b e Rab 3b foi confirmada na GL e estão diminuídas com o envelhecimento ( $p<0,05$ ), mas não há diferença na expressão gênica da Vamp.

## SUMMARY

Aging is responsible for functional and structural alterations in the lacrimal gland (LG), including the accumulation of free radicals, leading to damage to proteins, lipids and DNA.

The objective of the present study was to evaluate the effect of aging on the structure and the secretory mechanisms of the LG.

Male Wistar rats aged 24 and 2 months were used. Tears secretion and impression cytology of the cornea were compared. The LG were removed and submitted to structural and morphologic comparison, and analysis of the expression of peroxidase, acetylcholine, vitamin E and MDA. RT PCR was used for the analysis of mRNA expression.

Impression cytology demonstrated increased metaplasia in the cornea of the aging group ( $p=0.0320$ ). The Schirmer test was similar in both groups ( $8.8 \pm 1.0$  mm for the control and  $7.3 \pm 1.4$  mm for the aging group,  $p=0.5145$ ). The LG of the aging group showed increased MDA ( $11.0 \pm 0.89$  mmol/g and  $24.6 \pm 1.65$  mmol/g,  $p=0.0571$ ) and peroxidase ( $1.15 \pm 0.52$  and  $1.05 \pm 0.09$  mU/mg of LG weight,  $p=0.34$ ) and reduced vitamin E ( $4.98 \pm 0.50$   $\mu$ M and  $1.79 \pm 0.18$   $\mu$ M,  $p=0.0159$ ). The expression of Rab 27b and Rab 3b mRNA was confirmed and decreased with aging ( $p < 0.05$ ).

These findings indicate that secretory and antioxidant mechanisms may be impaired with aging and agree with LG and tear film dysfunction.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbey, M. (1991). "Antioxidant vitamins and low-density- lipoprotein oxidation." *Am. J. Clin. Nutr* 53: 201-205.
- Adeghate, C. E. D. J. S. E. (2003). "Effects of age on morphology, protein synthesis and secretagogue-evoked secretory responses in the rat lacrimal gland. " *Molecular and Cellular Biochemistry* **248**: 7-16.
- Arnaud, J., I. Fortis, et al. (1991). "Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and beta-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography." *J Chromatogr* 572(1-2): 103-16.
- Bonifacino, J. S. and B. S. Glick (2004). "The mechanisms of vesicle budding and fusion." *Cell* **116**(2): 153-66.
- Bromberg, B. B. and M. H. Welch (1985). "Lacrimal protein secretion: comparison of young and old rats." *Exp Eye Res* **40**(2): 313-20.
- Buege, J. A. and S. D. Aust (1978). "Microsomal lipid peroxidation." *Methods Enzymol* 52: 302-10.
- da Costa, S. R., K. Wu, et al. (2005). "Male NOD mouse external lacrimal glands exhibit profound changes in the exocytotic pathway early in postnatal development." *Exp Eye Res.*

Dartt, D. A., R. R. Hodges, et al. (1998). "Signal transduction pathways activated by cholinergic and alpha 1-adrenergic agonists in the lacrimal gland." Adv Exp Med Biol **438**: 113-21.

Dias AC, Modulo CM, Jorge AG, Braz AM, Jordao AA, Jr., Filho RB, de Paula JS & Rocha EM (2007). Influence of thyroid hormone on thyroid hormone receptor beta-1 expression and lacrimal gland and ocular surface morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 3038-3042.

Draper, C. E., J. Singh, et al. (2003). "Effects of age on morphology, protein synthesis and secretagogue-evoked secretory responses in the rat lacrimal gland." Mol Cell Biochem **248**(1-2): 7-16.

Esterbauer, H. and K. H. Cheeseman (1990). "Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal." Methods Enzymol **186**: 407-21.

Fujita-Yoshigaki, J., Y. Dohke, et al. (1996). "Vesicle-associated membrane protein 2 is essential for cAMP-regulated exocytosis in rat parotid acinar cells. The inhibition of cAMP-dependent amylase release by botulinum neurotoxin B." J Biol Chem **271**(22): 13130-4.

Jorge AG, Modulo CM, Dias AC, Braz AM, Filho RB, Jordao AA, Jr., de Paula JS & Rocha EM (2009). Aspirin prevents diabetic oxidative changes in rat lacrimal gland structure and function. *Endocrine*.

- Halliwell, B. (2006). "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life." Plant Physiol **141**(2): 312-22.
- Halliwell, B. and M. Whiteman (2004). "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?" Br J Pharmacol **142**(2): 231-55.
- Harman, D. (1994). "Free-radical theory of aging. Increasing the functional life span." Ann N Y Acad Sci **717**: 1-15.
- Holbrook, T. F. N. J. (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**: 239-247.
- Lemp, M. A. (1995). "Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes." Clao J **21**(4): 221-32.
- Looms, D. K., K. Tritsarlis, et al. (2002). "Nitric oxide-induced signalling in rat lacrimal acinar cells." Acta Physiol Scand **174**(2): 109-15.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- Machinami, H. O. S. Y. H. H. R. (1995). "Histopathologic Study of human lacrimal gland." Ophthalmology **102**(4): 678-686.

McCarty, M. F. (1998). "Nitric oxide deficiency, leukocyte activation, and resultant ischemia are crucial to the pathogenesis of diabetic retinopathy/neuropathy--preventive potential of antioxidants, essential fatty acids, chromium, ginkgolides, and pentoxifylline." Med Hypotheses **50**(5): 435-49.

Modulo, C. M., A. G. Jorge, et al. (2009). "Influence of insulin treatment on the lacrimal gland and ocular surface of diabetic rats." Endocrine **36**(1):161-8.

Moss, S. E., R. Klein, et al. (2000). "Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome." Arch Ophthalmol **118**(9): 1264-8.

Nicotera, P. and S. Orrenius (1986). "Role of thiols in protection against biological reactive intermediates." Adv Exp Med Biol **197**: 41-51.

Obata, H., S. Yamamoto, et al. (1995). "Histopathologic study of human lacrimal gland. Statistical analysis with special reference to aging." Ophthalmology **102**(4): 678-86.

Ohia, S. E., C. A. Opere, et al. (2005). "Pharmacological consequences of oxidative stress in ocular tissues." Mutat Res **579**(1-2): 22-36.

Pflugfelder SC, J. D., Ji Z, Afonso A, Monroy D. (1999). "Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's

syndrome keratoconjunctivitis sicca." Curr Eye Res. 1999 Sep;19(3):201-11.

Ramos-Remus, C., M. Suarez-Almazor, et al. (1994). "Low tear production in patients with diabetes mellitus is not due to Sjogren's syndrome." Clin Exp Rheumatol **12**(4): 375-80.

Rios, J. D., Y. Horikawa, et al. (2005). "Age-dependent alterations in mouse exorbital lacrimal gland structure, innervation and secretory response." Exp Eye Res **80**(4): 477-91.

Rocha, E. and C. S. Carvalho, MJA; Velloso, LA (2003). "The influence of ageing on the insulin signalling system in rat lacrimal and salivary glands." Acta Ophthalmologica Scandinavica **81**: 639-645.

Rocha, E. M., M. Alves, et al. (2008). "The Aging Lacrimal Gland: Changes in Structure and Function." Ocul Surf **6**(4): 162-174. could contribute to loss of lacrimal gland secretion with age. More research in this area is critically needed.

Rocha EM, d. M. L. M., Carvalho CR, Saad MJ, Velloso LA. (2000). "Characterization of the insulin-signaling pathway in lacrimal and salivary glands of rats." Curr Eye Res. 2000 Nov;21(5):833-42.

- Rocha EM, W. L., Huang Z, Toda I, Gao J, da Silveira LA, Sullivan DA. (1998). "Presence and testosterone influence on the levels of anti- and pro-inflammatory cytokines in lacrimal tissues of a mouse model of Sjögren's syndrome." Adv Exp Med Biol. 1998;438:485-91.
- Rocha, E. M., M. Alves, et al. (2008). "The Aging Lacrimal Gland: Changes in Structure and Function." Ocul Surf **6**(4): 162-174.
- Sedlak, J. and R. H. Lindsay (1968). "Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent." Anal Biochem **25**(1): 192-205.
- Schaumberg, D. A., D. A. Sullivan, et al. (2002). "Epidemiology of dry eye syndrome." Adv Exp Med Biol **506**(Pt B): 989-98.
- Schein, O. D., B. Munoz, et al. (1997). "Prevalence of dry eye among the elderly." Am J Ophthalmol **124**(6): 723-8.
- Seifart, U. and I. Stempel (1994). "[The dry eye and diabetes mellitus]." Ophthalmologie **91**(2): 235-9.
- Shui YB, H. N., Kramer BC, Crowley JR, Wilkins MA, Chu F, Malone PE, Mangers SJ, Hou JH, Siegfried CJ, Beebe DC. (2009). "The gel state of the vitreous and ascorbate-dependent oxygen consumption: relationship

to the etiology of nuclear cataracts." Arch Ophthalmol. 2009  
Apr;127(4):475-82.

Solomon A, D. D., Liu Z, Xie Y, Macri A, Pflugfelder SC. (2001). "Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease." Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001  
Sep;42(10):2283-92.

Sullivan, D. (1999). "Immunology of the lacrimal gland and tear film." Dev Ophthalmol. 1999;30:39-53. Review. .

Sullivan DA (1997). "Sex hormones and Sjögren's syndrome." J Rheumatol Suppl. 1997 Sep;50:17-32. Review. .

Sullivan DA, Hann LE, Yee L & Allansmith MR (1990). Age- and gender-related influence on the lacrimal gland and tears. *Acta Ophthalmol (Copenh)* **68**, 188-194.

Sundermeier, T., G. Matthews, et al. (2002). "Calcium dependence of exocytosis in lacrimal gland acinar cells." Am J Physiol Cell Physiol **282**(2): C360-5.

Toda I, S. B., Rocha EM, Da Silveira LA, Wickham LA, Sullivan DA. (1999). "Impact of gender on exocrine gland inflammation in mouse models of Sjögren's syndrome." Exp Eye Res. 1999 Oct;69(4):355-66.

Wang, Y., G. Jerdeva, et al. (2003). "Cytoplasmic dynein participates in apically targeted stimulated secretory traffic in primary rabbit lacrimal acinar epithelial cells." J Cell Sci **116**(Pt 10): 2051-65.

Wilson, S. (1991). "Lacrimal gland epidermal growth factor production and the ocular surface." Am J Ophthalmol. 1991 Jun 15;111(6):763-5.

Zoukhri, D. and C. L. Kublin (2001). "Impaired neurotransmitter release from lacrimal and salivary gland nerves of a murine model of Sjogren's syndrome." Invest Ophthalmol Vis Sci 42(5): 925-32.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)