

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Carolina Maria Módulo

Papel da Dislipidemia na estrutura e função da Glândula Lacrimal,
Glândula de Meibomius e Superfície Ocular em camundongos.

Ribeirão Preto
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Carolina Maria Módulo

Papel da Dislipidemia na estrutura e função da Glândula Lacrimal,
Glândula de Meibomius e Superfície Ocular em camundongos.

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas.

Área de Concentração: Mecanismos
Fisiopatológicos nos Sistemas Visual
e Áudio-Vestibular.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Melani
Rocha

Ribeirão Preto
2010

A escrita desta dissertação seguiu as diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso Parte I, II, III e IV (ABNT) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; et al. 2. ed. rev. ampl. São Paulo: Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, 2009.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desta dissertação, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Módulo, Carolina Maria

Papel da Dislipidemia na estrutura e função da Glândula Lacrimal, Glândula de Meibomius e Superfície Ocular em camundongos / Carolina Maria Módulo; orientador Eduardo Melani Rocha - Ribeirão Preto, 2010.

66f. : il.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Áudio Vestibular.

1. Dislipidemia; 2. Glândula Lacrimal; 3. Glândula de Meibomius ; 4. Olho Seco ; 5. Superfície Ocular

Nome: Módulo, Carolina Maria

Título: Papel da Dislipidemia na estrutura e função da Glândula Lacrimal, Glândula de Meibomius e Superfície Ocular em camundongos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Áudio-Vestibular.

Aprovado em: 01/07/2010

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha

Julgamento: aprovada

Instituição: FMRP - USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. André Márcio Vieira Messias

Julgamento: aprovada

Instituição: FMRP - USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Mônica de Cássia Alves de Paula

Julgamento: aprovada

Instituição: PUC - Campinas

Assinatura: _____

A Deus

Grandes foram às lutas, maiores as vitórias.
Sempre estiveste comigo.
Tu estavas presente, na alegria ou na tristeza, fazendo da derrota uma vitória, da fraqueza uma força.
Com Tua ajuda venci.
A emoção é forte.
Não cheguei ao fim, mas ao início de uma longa caminhada.
Os mais sinceros agradecimentos a Ti que me confiaste à vida.

Dedico este trabalho com amor e gratidão aos meus pais, **Luiz e Sônia Módulo**, por cada sonho renunciado para que o meu fosse realizado. Em especial a minha mãe por sempre estar presente nos momentos bons e ruins, seja para sorrir ou chorar comigo.

Ao meu irmão **Marcio Rodrigo Módulo**, que independente das nossas desavenças, se importa muito comigo.

Ao meu namorado **Hilton César Ávila**, homem maravilhoso que eu pretendo me casar e continuar caminhando junto nesta vida.

A **Vani Maria Alves Correa**, com muito carinho por preencher o posto de 2ª mãe se tornando indispensável em minha vida.

Ao meu orientador **Eduardo Melani Rocha**, minha eterna admiração por transmitir seu conhecimento e suas experiências profissionais e de vida com dedicação, carinho e muita paciência contribuindo para o meu crescimento científico e profissional.

A **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)**, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao **Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMRP**. Em especial aos docentes: **Prof.^a Dr.^a. Maria de Lourdes Veronese, Prof. Dr. Jayter Silva de Paula e Prof. Dr. Sidney Júlio Faria**, por todo conhecimento fornecido, aos funcionários: **Maria Cecília** (por toda sua paciência, orientação, processamento do material), **Amélia Baruffi, Rita Diegues, Édson Beragua, Rogério Castania** (por todo carinho e apoio), e aos pós-graduandos **Giselle Seixas** (sempre disposta a ajudar) e **Denny Garcia** (por transmitir seu conteúdo em informática), obrigada a todos pela amizade e respeito.

Ao meu valioso **Grupo de Pesquisa: Carola** (melhor amiga e companheira), **Lilian, Elísio e Leonardo** (grande amigo e “para raio” nas situações complicadas), por toda amizade, carinho e colaboração indispensável neste trabalho. Muito obrigada!

Ao **Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes da FMRP**. As **Prof^{as}. Maria Célia e Constance Oliver** e toda sua equipe, em especial Junior, Maria Rita, Vanina, aos queridos amigos e indispensáveis técnicos **Vani, Izilda, Tereza, Tuca, Cláudia, Zé, Domingos e Anderson**, e ao laboratório do **Prof. Dr. Jorge Cury** e seu grupo: **Gaby, Jú e Diego**, por todo carinho e tempo disponível.

Ao **Departamento de Fisiologia e Biofísica - Instituto de Biologia da Unicamp**, em especial ao **Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro** e a **Prof^a Dr^a colaborada deste trabalho Helena C. F. de Oliveira** e seu grupo de pesquisa: **Jane Cristina de Souza, Patrícia Riva, Rosane Ribeiro, Emerielle Vanzela, Thiago Martins Batista e Gabriel Dorighello**, por terem cedido os animais do grupo LDLRKO, LDLRKO/Hiper, ApoCIII e seus respectivos controles, e principalmente por terem me recepcionado de forma muito carinhosa e prestativa para a realização dos experimentos.

A **Profª Silvana S. Meyrelles** do Centro de Ciências da Saúde da UFES e seu grupo de pesquisa: **Italo Cade Jorge, Flávia P. S. Freitas e Isabele B. S. Gomes** por terem fornecido todo material do grupo ApoEKO.

Aos meus **amigos pós-graduandos do Departamento de Imunologia da FMRP: Luciana Almeida, Zé Eduardo, Everton Padilha (Pía) e Thiago Malardo**, por diversas vezes me apoiarem nos momentos de desespero e principalmente por me proporcionarem momentos de muita diversão.

As minhas amigas **Catarina Horta e Taty Lippi**, vocês duas são incomparáveis e valiosas na minha vida. Muito obrigada pelo carinho recíproco.

Ao meu **amigo Prof. Dr. Rubens Bertazolli-Filho** sou imensamente grata por ter dedicado seu tempo fornecendo parte de todo seu conteúdo científico a mim e principalmente por ter me mostrado muitas vezes nas dificuldades que eu era capaz.

Aos **animais de laboratório** que involuntariamente cederam suas vidas para o estudo da ciência.

A **Banca examinadora** pelo aceite e toda sua disponibilidade em corrigir o boneco da dissertação.

Aos apoios financeiros **CAPES** (início do projeto), a tão esperada bolsa **FAPESP** (pela concessão da bolsa) e a **FAEPA** pela atenção e auxílio.



"Por mais longa que seja a caminhada o mais importante é dar o primeiro passo".

Vinícius de Moraes



“O direito de usar é inseparável do dever de não abusar desse direito.”

“O que o bem-estar animal precisa é de pessoas educadas com cabeças frias e corações quentes preparados para ver o sofrimento dos animais e procurando meios práticos de aliviá-los.”

Charles Hume
(UFAW – Universities Federation for Animal Welfare)

RESUMO

Módulo, C. M. (2010). Papel da Dislipidemia na estrutura e função da Glândula Lacrimal, Glândula de Meibomius e Superfície Ocular em camundongos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Objetivo: A Dislipidemia é definida pela presença de altos níveis de lipídios ou lipoproteínas no sangue e é causada pela combinação de fatores genéticos e ambientais. Prévios estudos mostraram conflitos na correlação entre a dislipidemia e a síndrome do olho seco. O objetivo do presente estudo foi investigar os achados funcionais e estruturais da síndrome do olho seco em animais dislipidêmicos com dieta normal ou dieta hiperlipídica.

Métodos: Camundongos machos e fêmeas adultos (n = 5/grupo) que super-expressão a apolipoproteína CIII (ApoCIII), knockout para ApoE (ApoEKO) com dieta normal e knockout para o receptor LDL com dieta normal (LDLRKO) e hiperlipídica (LDLRKO-hiper) foram comparados com seus respectivos controles C57BL/6. Os animais foram anestesiados e avaliados pelo teste do fenol vermelho, exame da córnea com lâmpada de fenda e citologia de impressão da córnea (CI). Amostras de sangue, da glândula lacrimal (GL), glândula de Meibomius (GM) e córnea também foram avaliadas.

Resultados: O peso corpóreo foi maior em camundongos machos ($P < 0,05$) quando comparados com as fêmeas. O peso corpóreo foi maior nos camundongos fêmeas controles do que nos camundongos fêmeas LDLRKO-hiper ($P = 0.0043$) e machos LDLRKO do que em fêmeas LDLRKO-hiper ($P = 0.0016$). O peso da glândula lacrimal foi maior em camundongos machos LDLRKO ($P = 0.0003$), LDLRKO-hiper ($P < 0.0001$), ApoEKO ($P = 0.0022$) e Apo CIII ($P = 0.0116$) do que em suas respectivas fêmeas. O teste do fenol vermelho foi menor em camundongos machos LDLRKO-hiper do que em camundongos machos controle com dieta normal ($P = 0.0273$). Exame da córnea, CI e análises histológicas da GL, GM e córnea não mostram nenhuma diferença entre os grupos.

Conclusões: Os presentes dados contradizem a hipótese de que a dislipidemia esteja envolvida com a síndrome do olho seco. Entretanto, o perfil da dieta associado ao aspecto genético e o sexo masculino tem impacto funcional na glândula lacrimal. Isto sugere que vários fatores estão envolvidos com a disfunção do filme lacrimal na dislipidemia.

Palavras Chave: Dislipidemia, Glândula Lacrimal, Glândula de Meibomius, Olho Seco, Superfície Ocular.

ABSTRACT

Purpose: Dyslipidemia is defined in the presence of high levels of lipids or lipoproteins in blood and is caused by a combination of genetic and environmental factors. Previous studies have reported conflicting data about the correlation between dyslipidemia and dry eye syndrome. The aim of the present study was to investigate the functional and structural findings of dry eye syndrome in animal models of dyslipidemia with standard diet or hyperlipidic diet.

Methods: Male and female mice adult (n = 5/group) that overexpression the apolipoprotein CIII (Apo CIII), ApoE knockout (ApoEKO) with standard diet and LDL receptor knockout with standard diet (LDLRKO) and hyperlipidic diet (LDLRKO-hyper) were compared with sex and age matched C57BL/6 controls. The animals were anesthetized and evaluated by the phenol red thread test, by direct examination on slit lamp and impression cytology (IC) of cornea. Blood lipid profile and samples of meibomian and lacrimal glands were also evaluated.

Results: Body weight was significantly higher in male mice ($P < 0.05$) than in female mice of the matched strains. Body weight was significantly higher in female controls than in female LDLRKO-hyper mice ($P = 0.0043$) and in male LDLRKO than in female LDLRKO-hyper mice ($P = 0.0016$). The lacrimal gland weight was significantly higher in male LDLRKO ($P = 0.0003$), LDLRKO-hyper ($P < 0.0001$), ApoEKO ($P = 0.0022$) and Apo CIII ($P = 0.0116$) mice than in their respective female mice strains. The phenol red thread test was lower in male LDLRKO-hyper mice than control mice with standard diet ($P = 0.0273$). Direct examination, IC and histological analysis of meibomian and lacrimal glands did not show any difference among the groups.

Conclusions: The present data disagree with the prediction of mechanistic effects of dyslipidemia as a causative factor of dry eye syndrome. On the other hand, the dietary profile associated with the genetic aspect and the males have functional impact in the lacrimal gland. It suggests that various factors are involved in tear film dysfunction associated with dyslipidemia.

Keywords: Dyslipidemia, Lacrimal gland, Meibomian gland, Dry eye, Ocular surface.

LISTA DE ABREVIÇÕES

AGL - Ácidos graxos livres

ACAT 1 - AcilCoA: colesterol Acil Transferase 1

Apo CIII - Apolipoproteína CIII

Apo E – Apolipoproteína E

ApoEKO - *Knockout* para apoproteína E

Apos – Apoproteínas

CE - Colesterol esterificado

CETEA - Comissão de Ética em Experimentação Animal

CHD - Doença Cardiovascular

CI - Citologia de Impressão

CL - Colesterol livre

COL – Colesterol

Controle/hiper - Controle hipercolesterolêmico

CT - Colesterol total

CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

DAPI - 4-6-diamidino-2-phenylindole

FMRP- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

GL - Glândula lacrimal

GM - Glândula de Meibomius

GO - Globo ocular

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HE - hematoxilina – eosina

HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase

HMGCOA redutase - hidroximetil-glutaril COA redutase

IDL - Lipoproteína de densidade intermediária

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LDLr - Receptor de lipoproteína de baixa densidade

LDLRKO - *Knockout* para o receptor LDL

LDLRKO/hiper - *Knockout* para o receptor LDL hipercolesterolêmico

QM – Quilomícrons

SO - Superfície Ocular

TG – Triglicérides

VLDL - Lipoproteínas de densidade muito baixa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de Fredrickson.

Tabela 2 - Grupos em estudo.

Tabela 3 - Composição da dieta hiperlipídica.

Tabela 4 - Parâmetros estruturais e fisiológicos dos grupos em estudo. Os dados estão apresentados como média \pm EP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de uma lipoproteína. O centro hidrofóbico possui éster de colesterol e triglicérides. A superfície hidrofílica é constituída de apoproteínas, fosfolipídios e colesterol livre.

Figura 2 - Esquema da geração de animais transgênicos.

Figura 3 - Aspecto da pelagem de camundongos machos (A-F) e fêmeas (G-L) C57BL/6 (A-G), LDLRKO (B-H), LDLRKO/hiper (C-I) e ApoEKO (D-J) de 5 meses, e C57BL/6 (E-K) e ApoCIII (F-L) de 9 meses de idade. Mostrando que nos grupos LDLRKO e LDLRKO/hiper havia alopecia no dorso.

Figura 4 - Exame de lâmpada de fenda da córnea de camundongos machos (A-D) e fêmeas (E-H) C57BL/6 (A-E), LDLRKO (B-F), LDLRKO/hiper (C-G) e ApoEKO (D-H) de 5 meses de idade. Mostrando que as córneas dos animais apresentaram pálpebras íntegras.

Figura 5 - Exame de lâmpada de fenda da córnea de camundongos machos (A-B) e fêmeas (C-D) C57BL/6 (A-C) e ApoCIII (B-D) de 9 meses de idade. Mostrando que a maioria dos camundongos fêmeas apresentaram opacidade do cristalino.

Figura 6 - Citologia de impressão da superfície ocular (SO) de camundongos machos (A-C) e fêmeas (D-F) C57BL/6 (A-D), LDLRKO (B-E), LDLRKO/hiper (C-F) de 5 meses de idade. ($P > 0.05$; Teste de Fisher) Mostrando que a SO não apresentou diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

Figura 7 - Histologia da glândula lacrimal de camundongos machos (A-C) e fêmeas (D-F) C57BL/6 (A-D), LDLRKO (B-E) e LDLRKO/hiper (C-F) de 5 meses de idade. Coloração HE. Mostrando que não houve diferença entre os grupos.

Figura 8 - Histologia da glândula lacrimal de camundongos machos (A-B) e fêmeas (C-D) C57BL/6 (A-C) e ApoCIII (B-D) de 9 meses de idade. Coloração HE. Mostrando que não houve diferença entre os grupos.

Figura 9 - Histologia da glândula de Meibomius de camundongos machos (A-C) e fêmeas (D-F) C57BL/6 (A-D), LDLRKO (B-E) e LDLRKO/hiper (C-F) de 5 meses de idade. Coloração HE. Mostrando que não houve diferença entre os grupos.

Figura 10 - Histologia da glândula de Meibomius de camundongos machos (A-B) e fêmeas (C-D) C57BL/6 (A-C) e ApoCIII (B-D) de 9 meses de idade. Coloração HE. Mostrando que não houve diferença entre os grupos.

Figura 11 - Histologia da córnea de camundongos machos (A-C) e fêmeas (D-F) C57BL/6 (A-D), LDLRKO (B-E) e LDLRKO/hiper (C-F) de 5 meses de idade. Coloração HE. Mostrando que não houve diferença entre os grupos.

Figura 12 - Histologia da córnea de camundongos machos (A-B) e fêmeas (D-C) C57BL/6 (A-C) e ApoCIII (B-D) de 9 meses de idade. Coloração HE. Mostrando que não houve diferença entre os grupos.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Considerações Gerais.....	17
1.2 Superfície Ocular e filme lacrimal.....	17
A) Glândula Lacrimal.....	18
B) Glândula de Meibomius.....	19
1.3 Olho Seco.....	19
1.4 Transporte Lipídico.....	21
A) Lipoproteínas	21
B) Apoproteínas	23
1.5 Dislipidemia	24
1.6 Modelo animal transgênico.....	26
2 - OBJETIVOS.....	31
2.1 Geral.....	31
2.2 Específicos:.....	31
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Modelos animais	33
3.2 Desenho do Estudo.....	35
3.3 Após a anestesia.....	35
A) Medida do peso corpóreo.....	35
B) Análise do perfil do animal.....	35
C) Avaliação da córnea.....	36
D) Teste do Fenol Vermelho.....	36
E) Citologia de Impressão.....	36
F) Coleta de amostras de sangue.....	37
3.4 Após o sacrifício.....	37
A) Medida do peso da glândula lacrimal.....	37
B) Análises Histológicas.....	37
3.5 Estatística.....	38
4 - RESULTADOS	40
5 - DISCUSSÃO	50
6 - CONCLUSÕES.....	54
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
8 - ANEXO	66



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Nossos estudos anteriores (Dias, Modulo et al. 2007; Rocha, Alves et al. 2008; Jorge, Modulo et al. 2009; Modulo, Jorge et al. 2009) foram dedicados a compreender a influência hormonal, especialmente dos hormônios sexuais, da insulina e o diabetes *mellitus* e dos hormônios tireoidianos e o hipotireoidismo na disfunção da glândula lacrimal (GL), da glândula de Meibomius (Schutt, Bergmann et al.) e da superfície ocular (SO) (Rocha, de et al. 2000; Rocha, Wickham et al. 2000; Dias, Modulo et al. 2007).

Observamos que entre os mecanismos comuns de alteração estão as alterações metabólicas, o dano oxidativo e mediadores inflamatórios (Rocha, Carvalho et al. 2003; Alves, Cunha et al. 2005; Dias, Modulo et al. 2007).

Entre os componentes da lágrima estão os lipídeos que tem papel na dispersão, consistência, estabilidade e diminuição da evaporação da lágrima, e podem ter a sua composição e produção afetada pela dieta, idade, fatores hormonais e medicamentos, levando a olho seco (Krenzer, Dana et al. 2000; Moss, Klein et al. 2000; Bron, Tiffany et al. 2004; Sullivan, Evans et al. 2006).

A respeito da influência dos lipídeos na secreção lacrimal, estudos prévios observaram que a presença de HDL pode diminuir a secreção lacrimal em cultura e que camundongos deficientes da enzima AcilCoA: colesterol Acil Transferase (ACAT) desenvolvem hipercolesterolemia, fenótipo de olho seco e atrofia de GM (Hann, Kelleher et al. 1991; Yagyu, Kitamine et al. 2000).

1.2 Superfície Ocular e filme lacrimal

A superfície ocular compreende anatomicamente a mucosa margeada pelas bordas palpebrais, estendo-se da conjuntiva tarsal a superfície anterior do bulbo ocular, composta pela conjuntiva bulbar, limbo e córnea (Nelson 1982). Histologicamente, a superfície ocular é composta por epitélio estratificado não queratinizado da conjuntiva e da córnea. Estas células encontram-se firmemente aderidas uma às outras, apresentam distribuição uniforme e características próprias e do tecido de sustentação subjacente que variam conforme cada região (Tseng and Tsubota 1997; Faria e Souza, Romano et al. 2006)

O filme lacrimal é composto por lípidos, elaborado pelas glândulas de Meibomius, uma porção aquosa produzida pelas glândulas lacrimais e mucina das células calciformes conjuntivais e epitélio da córnea. Este filme recobre toda a superfície ocular, formando uma unidade integrada para proporcionar excelente qualidade óptica da visão, conforto e proteção contra invasão microbiana. A interface formada pelo epitélio que compõe a superfície ocular e o filme lacrimal é caracterizada pela interação entre glicocálice das células epiteliais e os receptores celulares para mucina. A mucina, por sua vez, forma um gradiente em toda extensão do filme lacrimal, garantido sua estabilidade (Watanabe 2002). Assim o filme lacrimal estável protege o epitélio da superfície ocular e este, por sua vez, participa na formação de alguns de seus constituintes (Nelson 1982; Lemp 1995; Tseng and Tsubota 1997; Pflugfelder 1998; Watanabe 2002). No filme lacrimal estão presentes ainda glicose, lactato, uréia, alguns hormônios como insulina, prolactina e hormônio tireoidiano, fatores de crescimento com EGF, TGF- β e IGF-1, além de vitamina A e diversos eletrólitos como Na⁺, K⁺, Ca⁺, Mg⁺, CL⁻, HCO₃⁻ (Ohashi, Motokura et al. 1989; Sullivan and Hann 1989; Gupta, Monroy et al. 1996; Ubels, Sulahian et al. 1997; Sullivan, Rocha et al. 1998; Rocha, Cunha et al. 2002).

A interface formada pela córnea e o filme lacrimal é considerada a principal superfície refrativa do olho humano. Esta interface necessita lubrificação contínua e homogênea, proporcionada pela lágrima, para qualidade óptica ideal. Variações significativas na acuidade visual são freqüentemente relatadas por pacientes portadores de olho seco (Rieger 1992; Huang, Tseng et al. 2002).

O entendimento dos conceitos de superfície ocular e filme lacrimal e sua integração como unidade funcional permitem categorizar de maneira mais apropriada a maioria das doenças oculares externas, tornando a compreensão de sua fisiopatogênese mais completa e específica e o direcionamento de métodos propedêuticos e condutas terapêuticas mais eficazes (Nelson 1982; Tseng and Tsubota 1997; Pflugfelder, Solomon et al. 2000; Kinoshita, Adachi et al. 2001).

A) Glândula Lacrimal

A glândula lacrimal é histologicamente formada por células acinares em forma de pirâmide, com o ápice direcionado para o centro do lúmen e com sua porção basal separada da membrana basal por células mioepiteliais, que atuam como células contráteis participando do processo de secreção. O espaço entre os ácinos é

preenchido por tecido conjuntivo que contém numerosos vasos sanguíneos, nervos não mielinizados e células plasmáticas. 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 (Bron, Tripathi et al. 1997). A lágrima contém diversos agentes atuando na vigilância imunológica da superfície ocular tais como, imunoglobulinas, lactoferrinas e lisozimas e fatores do crescimento responsáveis por estímulos de diferenciação e crescimento celular imprescindíveis à renovação epitelial e ao reparo de lesões oculares. As principais funções da glândula lacrimal são a síntese e a secreção de proteínas para o filme lacrimal que protege e lubrifica a superfície ocular (Sullivan, Rocha et al. 1998).

As glândulas lacrimais podem ser acometidas por doenças degenerativas que levam a uma progressiva perda funcional, com conseqüente manifestação de olho seco e alterações da superfície ocular. Tais doenças degenerativas podem ser decorrentes de uma adenite autoimune como o presente na Síndrome de Sjögren (Sullivan 1997; Toda, Sullivan et al. 1999), por alterações de caráter indeterminado presentes em doenças crônicas como DM (Sreebny 1989; Ramos-Remus, Suarez-Almazor et al. 1994; Seifart and Stempel 1994; Goebbels 2000), ou ainda no processo fisiológicos relacionados ao envelhecimento (Bromberg and Welch 1985; Schein, Tielsch et al. 1997; Zoukhri 2006), figuram como principais mecanismos de acometimento das glândulas lacrimais.

B) Glândula de Meibomius

As glândulas de Meibomius (GM) são responsáveis pela produção da camada lipídica do filme lacrimal. (Tiffany 1995) Essa camada é a mais superficial e tem por função diminuir a evaporação da porção aquosa da película lacrimal, secretada pela glândula lacrimal. A disfunção das GM diz respeito não só a uma diminuição na quantidade da secreção, mas também a uma alteração na composição dos lípidos da secreção (Tiffany 1995). A disfunção pode ser primária ou secundária, simples ou cicatricial. Pode estar associada a doenças sistêmicas como acne rosácea, dermatite atópica e seborreica.

1.3 Olho Seco

Olho seco é uma doença multifuncional das lágrimas e da superfície ocular que resulta em sintoma de desconforto, distúrbio visual, instabilidade da lágrima, com potencial dano a superfície ocular, acompanhado por aumento na osmolaridade da lágrima e inflamação da superfície ocular. (2007)

A prevalência de olho seco varia de 5 a 33% e essa variabilidade depende dos métodos de estudo e das características da população analisada (Bandein-Roche, Munoz et al. 1997; Schein, Munoz et al. 1997; Lemp 1998; McCarty, Bansal et al. 1998; Shimmura, Shimazaki et al. 1999; Lee, Lee et al. 2002; Schaumberg, Sullivan et al. 2002; Lin, Cheng et al. 2005).

Grandes estudos epidemiológicos sobre olho seco usam sintomas para avaliar prevalência e levantar fatores de risco. Alguns fatores de risco associam-se a maior ocorrência de sintomas de desconforto ocular relacionado ao olho seco com história de artrite reumatóide, tireiodopatias, DM, menopausa, algumas medicações como antidepressivos, diurético, anti-histamínicos, uso de lentes de contato, além de fatores ambientais e hábitos de vida (Lemp 1995; Schein, Tielsch et al. 1997; McCarty, Bansal et al. 1998; Moss, Klein et al. 2000; Schaumberg, Buring et al. 2001; Schaumberg, Sullivan et al. 2002).

Dados do Women's Health Study sugerem um risco aumentado de olho seco de quase 70% associado à terapia de estrógeno pós-menopausa e um risco 30% maior para mulheres usando estrógeno e progesterona. (Schaumberg, Buring et al. 2001).

Um estudo recente apresentou dados estimando que a prevalência de olho seco em pessoas com 50 anos ou mais nos EUA é de 7,8% para mulheres e 4,8% para homens (Schaumberg, Sullivan et al. 2003). Outro estudo durante um período de 5 anos, com 322 indivíduos de uma amostra de 2.414, mostrou para uma incidência de 13,3% (95% intervalo de confiança [IC], 12,0% -14,7%), que a incidência de olho seco está significativamente associada com a idade ($P < .001$) (Moss, Klein et al. 2004).

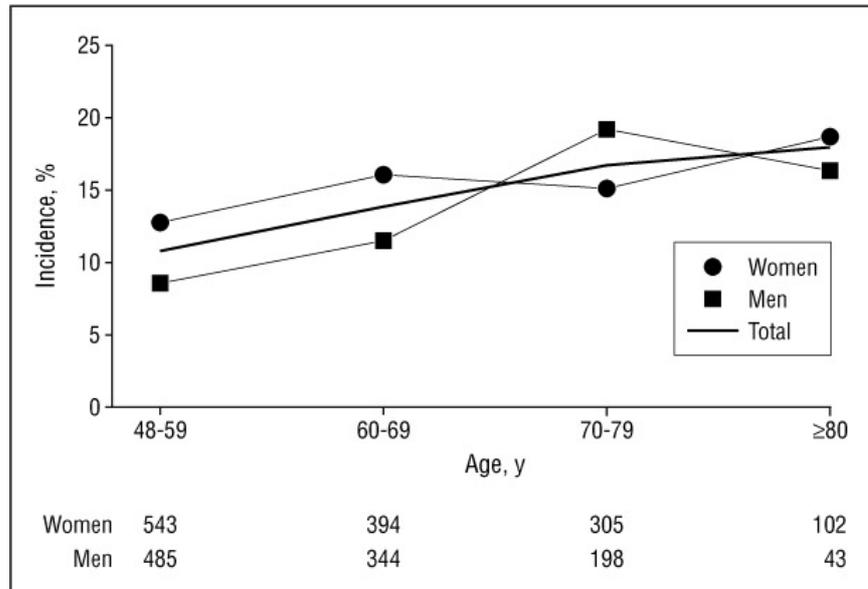


Figure 2. The 5-year incidence of dry eye by age and sex in the Beaver Dam Eye Study. Numbers constitute the sample sizes.

Fonte: Moss, SE et al - Arch Ophthalmol, 2004.

Após o ajuste para idade, a incidência não foi significativamente associada com o sexo, pressão arterial, hipertensão, soro total ou níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL), índice de massa corporal, história de artrite, gota, osteoporose, doenças cardiovasculares, doenças da tireóide, fumo, uso de cafeína, vitaminas, medicações antioxidantes, antidepressivos, bloqueadores dos canais de cálcio, ou anticolesterolêmicos. ((Moss, Klein et al. 2004)

1.4 Transporte Lipídico

Os lipídios, tais como os fosfolipídios, triglicérides e colesterol por serem apolares e insolúveis em água, necessitam serem carreados *in vivo* em partículas denominadas lipoproteínas para serem transportados no plasma sanguíneo para os tecidos periféricos.

A) Lipoproteínas

As lipoproteínas são formadas por uma camada hidrofílica constituída de proteínas denominadas apolipoproteínas ou apoproteínas, fosfolipídios e colesterol livre envolvendo um núcleo hidrofóbico contendo triglicérides e ésteres de colesterol, responsáveis pelo transporte de lipídios no plasma (Mahley RW 2006). (Figura 1)

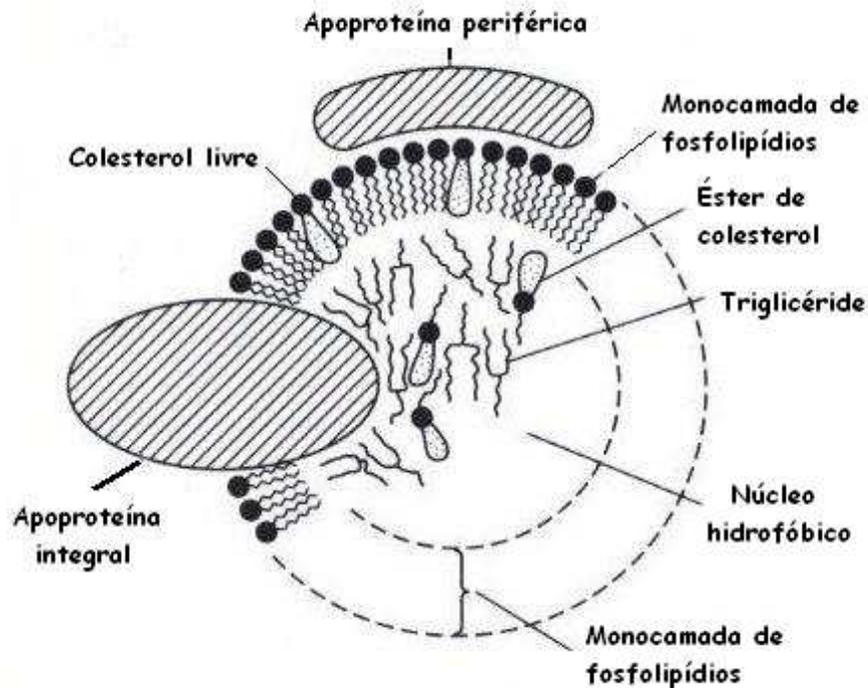


Figura 1 - Representação esquemática de uma lipoproteína. O centro hidrofóbico possui éster de colesterol e triglicérides. A superfície hidrofílica é constituída de apoproteínas, fosfolípidios e colesterol livre.

As lipoproteínas são classificadas em três grandes classes, conforme as suas densidades: Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa - *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL), de Densidade Baixa - *Low Density Lipoproteins* (LDL) e de Densidade Alta - *High Density Lipoproteins* (HDL). Outros dois grupos também são relacionados: os Quilomícrons (QM), que são menos densos do que as VLDL e as lipoproteínas de densidade intermediária - *Intermediate Density Lipoproteins* (IDL) que possui densidade variando entre as densidades de VLDL e LDL. As densidades das partículas aumentam dos QM para HDL enquanto que o tamanho das partículas diminui dos QM para HDL. Além da densidade, a porcentagem de proteínas também aumenta dos QM para HDL.

Semelhantemente ao colesterol, o LDL-colesterol (LDL-C) - colesterol transportado pelas partículas LDL - em altos níveis também aumenta o risco de doenças cardiovascular - *Coronary Heart Disease* (CHD). No entanto, o nível de HDL colesterol (HDL-C) – colesterol transportado pelas partículas HDL - possui uma associação negativa com o risco de CHD, o que significa que altos níveis de HDL-C conferem um risco reduzido (Jong, Gijbels et al. 1998). Devido às suas respectivas

associações com o risco de CHD, o LDL-C é normalmente designado de “mau colesterol” e o HDL-C como “bom colesterol”.

B) Apoproteínas

As apoproteínas (apos) são proteínas que constituem a camada hidrofílica das lipoproteínas. Elas são codificadas por genes específicos, representadas por grupos principais e numerosos subgrupos. São eles: apo A (I, II e IV), B (100 e 48), C (I, II e III), D e E.

As principais apos desempenham um papel específico no metabolismo lipídico, seja ativando ou inibindo determinadas enzimas e no transporte lipídico atuando como sinalizadoras.

Neste estudo trabalhamos com as apos CIII e E:

- **ApoCIII**

A apo CIII é uma proteína sintetizada no fígado e em menor quantidade no intestino, considerada a mais abundante da família das apos C. Ela é secretada como constituinte das lipoproteínas ricas em triglicérides (TG) e das HDL. O gene que a codifica está localizado no cromossomo 19.

Estudos prévios têm demonstrado que a apo CIII pode contribuir para o desenvolvimento da hipertrigliceridemia na população humana (Ito, Azrolan et al. 1990) e várias evidências clínicas e experimentais sugerem que a apo CIII inibe a ação da lipoproteína lipase (LPL) resultando em menor geração de ácidos graxos livres (AGL) (Jeanpierre, Weil et al. 1984).

- **ApoE**

As apoE são sintetizadas no fígado, local de síntese primária, no intestino e no cérebro, locais de menor extensão. O gene responsável por sua síntese está localizado no cromossomo 19 (Lin-Lue 1985). A apoE é incorporada na HDL nascente, sob influência da (LCAT). Por ser um constituinte da superfície de lipoproteínas, principalmente VLDL, HDL e quilomícrons, a apoE desempenha um papel funcional nas lipoproteínas plasmáticas (Davignon 1988). A HDL acumula colesterol, e a apoE é, então rapidamente transferida para a VLDL e para a quilomicra, onde permanece enquanto a lipoproteína é catabolizada para IDL ou quilomicra remanescente, respectivamente. O catabolismo de partículas ricas em

lipídios, pode ser então modulado pela conformação da apoE, que pode influenciar a afinidade ligante/receptor (Dergunov 1994).

1.5 Dislipidemia

Designam-se dislipidemias as alterações metabólicas lipídicas decorrentes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo lipídico, que ocasionem repercussão nos níveis séricos das lipoproteínas.

1.5.1 Classificação Fenotípica, segundo a expressão clínico-laboratorial das Dislipidemias

As Dislipidemias são classificadas com base na classificação fenotípica de Fredrickson e col (Tabela 1) (referendada pela *World Health Organization* – OMS em 1970). O perfil lipídico é definido pelas determinações bioquímicas de colesterol total (CT), colesterol ligado à HDL ou HDL-colesterol (HDL-C), TG e do colesterol ligado à LDL ou LDL-colesterol (LDL-C) após jejum de 12 a 14 horas (IV Diretriz brasileira sobre Dislipidemias, 2007).

Tabela 1 - Classificação de Fredrickson

Tipo I	> Presença de quilomicrons falta da atividade da lipase lipoproteica devido sua não formação ou devido a não formação da apo C-II. Importante hipertrigliceridemia exogena com TG superiores a 1500mg/dl.
Tipo II	> Hipercolesterolemia, devido ausência total ou parcial dos receptores LDL ou defeitos genéticos causando sua disfunção.
Tipo IIa	> Exclusivamente hipercolesterolemia > 240 mg/dl
Tipo IIb	> Hipercolesterolemia associada a hipertrigliceridemia, ambas com valores entre 250 e 500 mg/dl.
Tipo III	> Elevações simultâneas e proporcionais (1:1) do CT e do TG, habitualmente superiores a 300 mg/dl, devido alteração da apo E com incapacidade de metabolização da IDL.
Tipo IV	> Hipertrigliceridemia isolada, geralmente maior que 300mg/dl. Defeito

	não totalmente conhecido podendo ser poligênico. Maior síntese de VLDL acompanhada ou não de incapacidade de sua metabolização.
Tipo V	> Hipertrigliceridemia, mas em valores superiores a 1500mg/dl. Ocorre aumento do TG exógeno e endógeno. Ocorre sempre redução da atividade da lipase lipoprotéica e aumento de síntese de VLDL.

1.5.2 Classificação Etiológica das Dislipidemias

De acordo com a sua etiologia, as dislipidemias podem ser primárias ou secundárias. (IV Diretriz brasileira sobre Dislipidemias, 2007).

A) Primárias: Condiionadas geneticamente na maioria dos casos, ditas também "familiares" são divididas em monogênicas nos quais a mutação ocorre em um único gene ou poligênica, causada pela associação de múltiplas mutações que isoladamente não seriam de grande repercussão (Calandra and Bertolinio 1999). Essas mutações pode se traduzir em defeitos relacionados à apoproteína, aos seus receptores ou ainda às enzimas que participam do sistema de transporte de lipídeos.

Em uma pequena porção de casos é possível identificar formas hereditárias com características peculiares e valores muito elevados de determinada lipoproteína. Exemplos: Hipercolesterolemia familiar (CT > 300 e LDL-c > 200); Hipertrigliceridemia familiar (TG > 500); Hiperlipidemia familiar combinada (CT > 300 e TG > 300 com elevações proporcionais das duas frações), uma doença muito rara que afeta cerca de 2% das populações ocidentais (Masucci-Magoulas, Goldberg et al. 1997).

As dislipidemias primárias podem ser divididas em quatro tipos:

Hipercolesterolemia isolada - aumento do colesterol total (CT) ≥ 200 mg/dL e/ou LDL-colesterol (LDL-C) ≥ 160 mg/dL é causada pela mutação no gene do receptor de LDL, resultando em receptores defeituosos ou na ausência dos mesmos nas células hepáticas ou tecidos periféricos (Goldstein JL 2001). Também pode ocorrer pela mutação das apos B 100 (Grundy 1990).

Hipertrigliceridemia isolada – aumento dos triglicérides (TG) ≥ 150 mg/dL refletindo desta maneira no aumento do volume de partículas ricas em TG (VLDL, IDL e QM) na presença de produção próximas do normal de apo B (Grundy 1990).

Hiperlipidemia mista - aumento do CT (≥ 200 mg/dL), do LDL-C (≥ 160 mg/dL), e TG (≥ 150 mg/dL). Sua causa ainda é desconhecida (Grundy 1990), acredita-se que múltiplos genes podem estar envolvidos.

Diminuição isolada do HDL-colesterol (HDL-C) ou associada a aumento dos TG ou LDL-C.

B) Secundárias: surgem em decorrência de outras doenças (hipotireoidismo, diabetes *mellitus*, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, obesidade) e pelo uso de alguns medicamentos como os esteróides anabolizantes, corticóides, inibidores de proteases entre outros (Henkin Y 1992).

Hábitos de vida inadequados também contribuem no desenvolvimento das dislipidemias como: o tabagismo que apresenta efeito adverso sobre as lipoproteínas diminuindo as HDL-C. O consumo regular de grandes quantidades de bebidas alcoólicas pode afetar o metabolismo de TG e aumentar do HDL-C (Krummel 1998).

Na prática clínica a grande maioria das dislipidemias pode ser exacerbada por fatores ambientais, tais como dieta rica em gordura e sedentarismo (Avramoglu, Basciano et al. 2006).

1.6 Modelo animal transgênico

Novas linhagens de camundongos geneticamente deficientes ou hiperprodutores de enzimas que alteram o perfil lipídico sérico e, portanto podem induzir doenças semelhantes de humanos, tem ajudado a compreender a fisiopatologia dos danos provocados por dislipidemias (Amaral, Oliveira et al. 2002; Berti, de Faria et al. 2005).

A) Animais *Knockout*

O modelo *knockout* por Mario Capecchi, Martin Evans e Oliver Smithies (Manis 2007) proporcionou a possibilidade do uso de linhagens animais isogênicas, através da supressão de genes específicos, permitindo a criação de modelos com as mais diversas características genéticas e inaugurando uma nova era na biologia

experimental. Isso proporcionou o estudo a fundo de inúmeros fatores específicos relacionados aos processos fisiopatológicos de doenças semelhantes de humanos, como, por exemplo, os modelos *knockout* deste estudo.

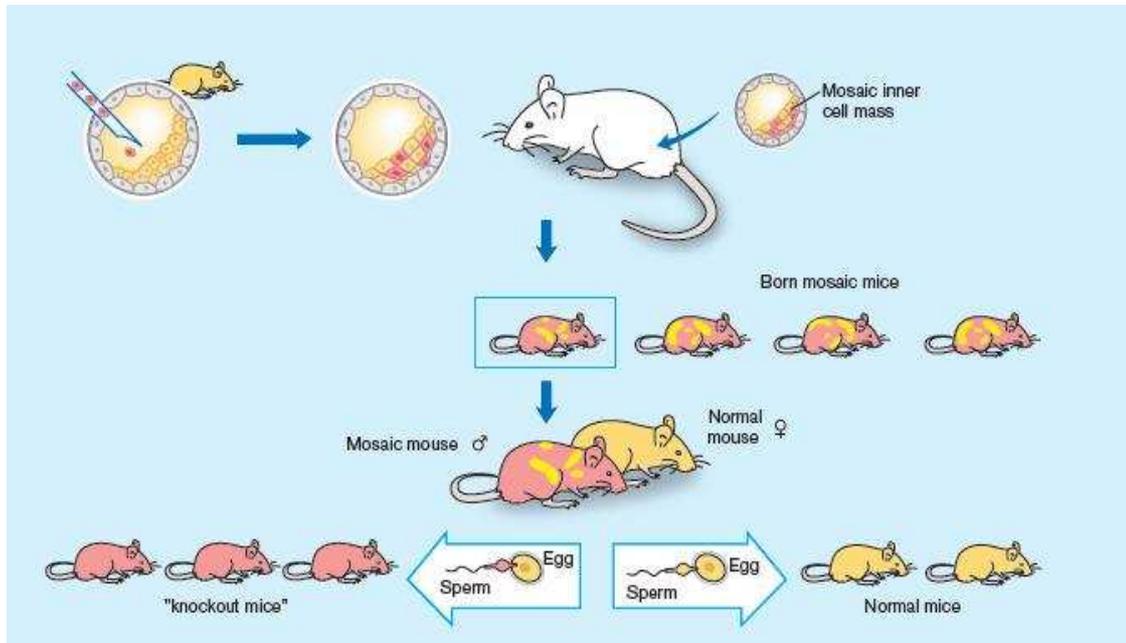


Figura 2 – Esquema da geração de animais transgênicos. Modificado de: Röhl, A. (The Nobel Committee for Physiology or Medicine, 2007)

- **Knockout para o receptor LDL (LDLRKO)**

Ishibashi et al. (1993) empregaram a técnica da recombinação homóloga em células embrionárias para produzir camundongos com o gene do receptor de LDL inativado e assim reproduziram o fenótipo da hipercolesterolemia familiar (Ishibashi, Brown et al. 1993). Camundongos machos e fêmeas que não expressam receptor de LDL (camundongos LDLRKO) são viáveis e férteis. Sob dieta pobre em gordura e colesterol, o nível de colesterol plasmático destes animais é de 2 a 4 vezes maior que nos camundongos selvagens, devido a um aumento de 7 a 9 vezes nas concentrações de lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL), sem uma significativa mudança nas lipoproteínas de alta densidade (HDL). O tempo de metabolização de IDL e LDL nos camundongos LDLRKO está aumentado em 30 vezes e 2 vezes respectivamente, mas o de HDL é normal (Ishibashi, Brown et al. 1993).

O receptor de LDL (LDLr) tem papel fundamental na homeostase do colesterol, pois regula a absorção de lipoproteínas que fornecem o colesterol

necessário tanto para a biogênese das membranas celulares, quanto para a formação de ácidos biliares e esteróides. Os hepatócitos são o principal sítio de remoção de lipoproteínas da circulação, porém os LDLr são também expressos em um grande número de outras células, como por exemplo nos fibroblastos ((Ishibashi, Brown et al. 1993).

Os LDLr são produzidos pelo retículo endoplasmático e complexo de Golgi e vão para a superfície da célula, onde são ligados a proteínas que após se envaginarem na membrana, se dissociam formando endossomos. Após ligarem-se ao LDL, os receptores o carregam para o interior do endossomo por endocitose. Nos endossomos, as lipoproteínas se dissociam dos receptores e, depois da fusão dos endossomos com lisossomos, ocorre digestão do LDL por enzimas hidrolíticas, o que permite a utilização do colesterol pela célula. Quando há um excesso de colesterol no interior dessa célula, ocorre redução na síntese de hidroximetil-glutaril COA redutase (HMGCOA redutase) que é a principal enzima da síntese de colesterol, e dos LDLr. Assim, pode ocorrer diminuição tanto na síntese dos receptores, como da enzima responsável pela sua síntese (Gent J 2004) quando, por exemplo, o consumo de gordura na dieta é elevado ou o LDLr está ausente no organismo. A absorção celular de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) contribui para diminuição de lipoproteínas e do colesterol circulante. Dessa forma, o LDLr é um mediador da remoção de LDL do plasma e por estar ausente nos camundongos utilizados nesse estudo, representa um excelente modelo de dislipidemia.

- **Knockout para a apolipoproteína E (ApoEKO)**

O modelo deficiente em ApoE desenvolve hipercolesterolemia, mesmo sob dieta pobre em lipídios, a níveis próximos de 500mg/dL, principalmente devido as frações remanescentes de QM e VLDL. Ressalta-se ainda que, sob dieta rica em colesterol, os níveis chegam até a 1800mg/dL (Plump AS 1992).

Na literatura encontrou-se uma associação entre olho seco e camundongos ApoEKO (Yagyu, Kitamine et al. 2000). O ponto-chave do estudo de Yagyu *et al* era testar a hipótese de relação protetora entre a deficiência da enzima AcilCoA: colesterol Acil Transferase 1 (ACAT1) e o surgimento e/ou progressão da aterosclerose. Deste modo, utilizou-se um modelo animal com ausência desta enzima (ACAT1KO) e o cruzou com outros animais dislipidêmicos (APOEKO e LDLRKO) já conhecidos como modelo para o surgimento de lesões ateroscleróticas.

Mas antes desse cruzamento, notou-se que o animal ACAT1KO, inesperadamente, apresentou, com penetrância quase que completa, uma aparência facial alterada devido ao estreitamento da fissura palpebral. Nenhuma outra anormalidade no tecido ocular e periocular foi encontrada, a não ser por erosão corneal associada à atrofia das glândulas de Meibomius (GM), fenótipo de olho seco.

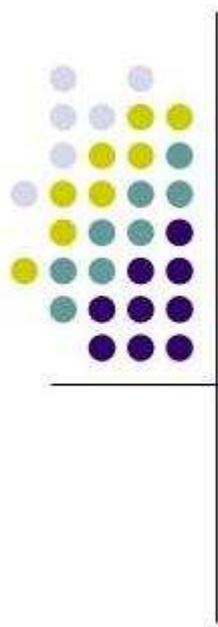
Nesse contexto, a análise bioquímica da GM revelou um aumento da fração de colesterol livre ($p < 0,001$), e diminuição dos ésteres de colesterol ($p < 0,001$). Sem a capacidade de afirmar, entretanto, se a causa de disfunção da GM seria devido a apenas uma dessas condições, ou sua associação. Além disso, os modelos ACAT1KO hipercolesterolêmicos, isto é, deficientes em ApoE ou receptores de LDL apresentaram maior grau de acometimento de tecido, atrofia das glândulas sebáceas, perda de pelo, pele áspera e grossa.

Como estudos anteriores postulavam a suspeita de que o modelo ApoEKO poderia desenvolver atrofia da GM, este foi um dos modelos animais escolhidos para este estudo, buscando assim a compreensão da dinâmica envolvida no metabolismo dos lipídeos para a composição do filme lacrimal, e portanto, sua associação com a Síndrome do Olho Seco.

B) Animais *Knockin*

- **Knockin para hiper-expressão da ApoCIII**

Camundongos que super-expressam a apo CIII desenvolvem hipertrigliceridemia severa, aumento moderado de colesterol e aumento acentuado de ácidos graxos livres (AGL) (Ito, Azrolan et al. 1990; Aalto-Setälä, Fisher et al. 1992). Este fenótipo resulta principalmente de uma redução na taxa fracional de remoção plasmática das VLDL nestes animais (Aalto-Setälä, Fisher et al. 1992). Mesmo na presença de elevados níveis de triglicérides (TG) e AGL, a homeostase glicêmica e secreção de insulina nestes animais são normais (Amaral, Oliveira et al. 2002) (Amaral, Oliveira et al. 2002). Quando submetidos à dieta normal, estes animais não diferem dos controles em termos de comportamento geral, crescimento, fertilidade e longevidade. Ao contrário da dieta normal, quando submetidos a dieta rica em colesterol eles desenvolvem mais aterosclerose e outras alterações do que os controles (Aalto-Setälä, Fisher et al. 1992).



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

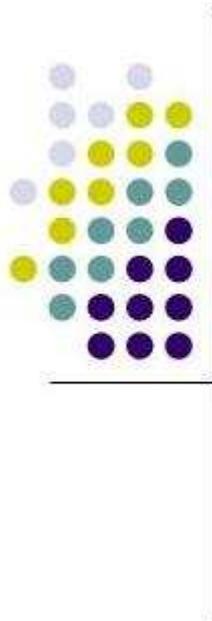
Objetivo desse estudo foi investigar as alterações histológicas e funcionais em tecidos relacionados à produção lacrimal de camundongos dislipidêmicos, comparando-os com animais do mesmo sexo, faixa etária e com metabolismo lipídico normal.

2.2 Específicos

A. Analisar os parâmetros estruturais e metabólicos dos camundongos controles e dos camundongos dislipidêmicos: LDLRKO, LDLRKO/hiper, ApoEKO e ApoCIII;

B. Comparar a produção lacrimal e o aspecto da superfície ocular nos mesmos grupos;

C. Avaliar a estrutura da GL, GM e córnea nos mesmos grupos.



MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelos animais

Para os estudos comparando animais adultos dislipidêmicos com adultos normais foram utilizados 70 camundongos machos e fêmeas de 5 e 9 meses. Destes animais, 60 foram fornecidos pelo laboratório da Profa. Helena C. F. Oliveira do Departamento de Fisiologia e Biofísica - Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), e 10 foram fornecidos pelo laboratório da Profª Silvana S. Meyrelles do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), aprovados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio (Nº 0069/98 – data da publicação 04/09/1998),

Os grupos foram assim distribuídos (Tabela 2): os animais dos grupos A, C, E, F e G foram acondicionados em caixas com 5 animais, com dieta padrão para roedores (Nuvilab CR1®) e água *ad libitum*. Em quanto que os animais dos grupos B e D foram acondicionados em caixas com 5 animais, com dieta hiperlipídica tipo Western, com 40% da energia representadas por lipídios (Tabela 3) e água *ad libitum*.

Tabela 2 – Grupos em estudo.

Grupos	Sexo	N	Idade	Modelo
A Controle	Macho	5	5 meses	animais controles
	Fêmea	5		
B Controle/hiper	Macho	5	5 meses	animais controles com dieta hiperlipídica
	Fêmea	5		
C LDLRKO	Macho	5	5 meses	animais <i>knockout</i> para o receptor de LDL
	Fêmea	5		
D LDLRKO/hiper	Macho	5	5 meses	animais <i>knockout</i> para o receptor de LDL tratados com dieta hiperlipídica
	Fêmea	5		
E ApoEKO	Macho	5	5 meses	animais <i>knockout</i> para apolipoproteína E
	Fêmea	5		
F Controle	Macho	5	9 meses	animais controles
	Fêmea	5		
G ApoCIII	Macho	5	9 meses	animais com hiper-expressão da apolipoproteína C III
	Fêmea	5		

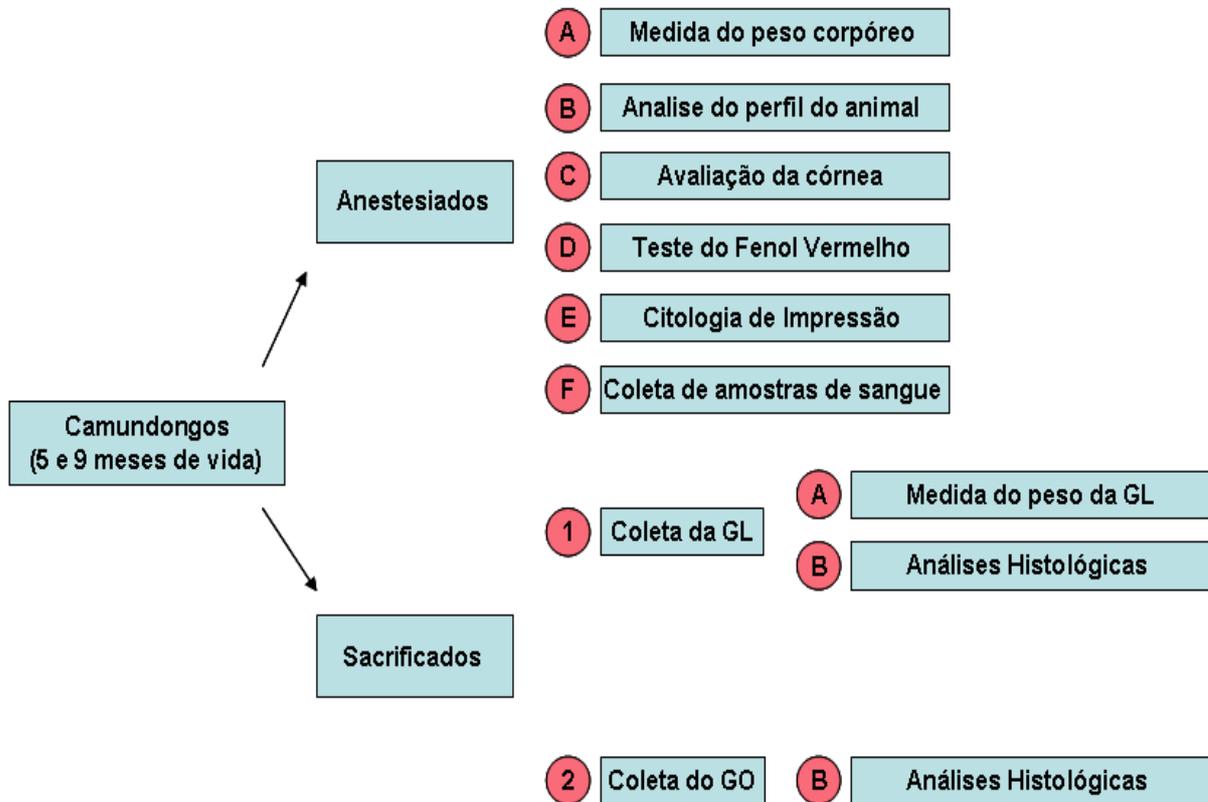
Tabela 3 – Composição da dieta hiperlipídica.

Componentes	g/Kg
Caseína	195,0
Amido de milho	320,7
Dextrina	79,6
Banha animal	50,0
Manteiga	204,0
Celulose	50,0
Mix mineral AIN-93M*	35,0
Mix vitamínico AIN-93M*	10,0
I-cistina	1,8
Bitartarato de colina	2,5
Sacarose	51,4
BHT	0,008

Composição detalhada apresentada em Reeves et al. 1993.

Os protocolos de estudo e o projeto seguem as diretrizes da *Association of Research in Vision and Ophthalmology* e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP (Processo nº 024/2008).

3.2 Desenho do Estudo



Os animais foram submetidos à anestesia intra-peritoneal com xilazina (15 mg/kg) e quetamina (150 mg/kg) para a realização dos métodos A, B, C, D, E e F seguido de eutanásia sob anestesia por decapitação para realização da coleta 1, métodos A e B, e coleta 2, método B, conforme o desenho do estudo acima e suas especificações logo abaixo.

3.3 Após a anestesia

A. Medida do peso corpóreo

Utilizando-se uma balança didática eletrônica (QUIMIS, Modelo Q510-1500, Diadema/SP – Brasil) pesamos todos os camundongos.

B. Análise do perfil do animal

Analisamos o perfil de todos os animais para observar se houve diferença entre os grupos e fizemos o registro fotográfico (DSC-W150, Sony Ltda - Japão).

C. Avaliação da córnea

Para determinar se houve lesões na córnea dos animais dos grupos C, D, E, e G quando comparados aos seus respectivos controles dos grupos A, B e F foram realizados exames oculares com lâmpada de fenda (Carl Zeiss, Ltda - Alemanha) e registro fotográfico (DSC-W5, Sony Ltda - Japão) com o uso de 1 gota de colírio de fluoresceína sódica (Allergan Produtos Farmacêuticos, Ltda – Brasil) em cada olho.

D. Teste do Fenol Vermelho

O teste do fenol vermelho (RPT ou “Red Phenol Test”) (Showa Yakuhin Kako Co. , Ltd, Tokyo, Japan & Menicon USA Inc., Clovis, CA, USA) foi utilizado para quantificar em milímetros a lágrima dos animais através dos cordões de fenol vermelho, os quais tiveram sua borda dobrada a 3 mm da extremidade superior para facilitar sua fixação na borda palpebral inferior e foram retirados após 15 segundos. (Barabino 2005)

E. Citologia de Impressão

As amostras de células do epitélio da SO dos grupos A, C, e D foram colhidas com papel de filtro (Millipore, Billerica, MA, USA), conforme descrição prévia. (Dias, Modulo et al. 2007) Em seguida foram submetidas a coloração com ácido periódico-Schiff (PAS) e contra-coradas com hematoxilina. As amostras foram classificadas de 0 a 3, conforme escala de Nelson:

Grau 0: As células epiteliais são pequenas e redondas com citoplasma eosinofílico. O núcleo é grande e basófilo, com relação núcleo/citoplasma de 1:1 ou 1:2. Há muitas células caliciformes ovais com citoplasma intensamente PAS positivo.

Grau 1: As células epiteliais são um pouco maiores, mais poligonais e com citoplasma eosinofilo. O núcleo é menor, com relação núcleo/citoplasma de 1:3. As células caliciformes estão em menor número, mas mantém sua forma oval e o citoplasma intensamente PAS positivo.

Grau 2: As células epiteliais são grandes e poligonais. Ocasionalmente são multinucleadas e o citoplasma de coloração variável. O núcleo é menor com relação núcleo/citoplasma de 1:4 ou 1:5. As células calciformes estão marcadamente diminuídas; são menores, com citoplasma pouco PAS positivo e seus limites celulares pouco definidos.

Grau 3: As células epiteliais são grandes, poligonais e com citoplasma basófilo. O núcleo é pequeno, picnótico ou ausente em algumas células. A relação núcleo/citoplasma é maior que 1:6. Células calciformes estão ausentes.

F. Coleta de amostras de sangue

Para confirmar o perfil metabólico compatível com a normalidade e dislipidemia foram analisados os níveis de colesterol e triglicérides das amostras de sangue colhidas dos animais anestesiados, sob jejum de 12 horas, através de um tubo capilar que foi introduzido na câmara anterior do olho, atingindo o plexo orbital. O soro obtido foi mantido em freezer -20°C para as análises utilizando um método colorimétrico, comparando os níveis aos valores de uma curva padrão.

3.4 Após o sacrifício - coleta da GL e do GO

A - Medida do peso da GL

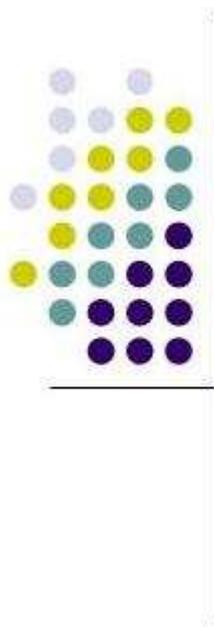
Utilizando-se uma balança eletrônica (BIOPRECISA, Modelo FA 2104N, Curitiba/PR – Brasil) as GL foram pesadas.

B - Análises Histológicas

A GL direita e esquerda e o GO direito coletados dos animais foram imediatamente embebidos em *optimal cutting temperature* (Tissue-Tek O.C.T compound, Sakura - EUA) e congelados em formato de blocos histológicos, os quais foram armazenados em freezer – 80°C e posteriormente foram utilizados num criostato para cortes seriados de 6 µm dispostos em lâminas de vidro gelatinizadas. As lâminas com os cortes dos tecidos de GL, GM e córnea foram mantidas congeladas em -20°C por aproximadamente 48 horas e logo após foram comparadas por colorações com hematoxilina-eosina de Harris (HE) para investigar as alterações estruturais das glândulas e da córnea.

3.5 Estatística

As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Mann Whitney U, devido ao pequeno número de animais por grupo e a não normalidade nas distribuições dos valores. Para comparações de variáveis categóricas (graduação de metaplasia da CI), usou-se o teste de Fischer. Cálculos foram realizados com o programa GraphPad Prism v. 5.0 (San Diego, CA, USA), apresentados como média \pm EP e valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.



RESULTADOS

4. RESULTADOS

1.1 Peso corpóreo

O peso corpóreo dos camundongos machos do grupo A foi maior que os dos grupos C ($p=0,0030$) e E ($p=0,0266$), e menor que os do grupo G ($p=0,0012$). (Tabela 4) Camundongos fêmeas do grupo A apresentaram o peso corpóreo maior que as fêmeas do grupo D ($p=0,0043$) e menor que as do grupo E ($p=0,0050$). (Tabela 4) Camundongos machos e fêmeas do grupo B tiveram seu peso corpóreo maior que dos grupos D ($p=0,0043$). (Tabela 4)

Quando comparamos machos com fêmeas, o peso corpóreo dos camundongos machos dos grupos A, B, C, D, E e G ($p=0,0007$; $p=0,0043$; $p=0,0127$; $p=0,0016$; $p=0,0152$ e $p=0,0238$) foi maior que das fêmeas. (Tabela 4)

1.2 Peso da glândula lacrimal

O peso da glândula lacrimal dos camundongos machos do grupo B foi menor que dos camundongos machos do grupo D ($p=0,00299$). (Tabela 4)

Quando comparamos machos com fêmeas, o peso da glândula lacrimal de todos os camundongos machos (A $p=0,0038$; B $p<0,0001$; C $p=0,0003$; D $p<0,0001$; E $p=0,0022$; F $p=0,0025$ e G $p=0,0116$) foi maior que das fêmeas. (Tabela 4)

1.3 Teste do Fenol Vermelho

Camundongos machos do grupo A apresentaram maior secreção lacrimal do que os camundongos machos do grupo D ($p=0,0273$). (Tabela 4)

1.4 Níveis de lipídios séricos

Em relação aos níveis de lipídios séricos de camundongos, o exame apontou hipercolesterolemia nos animais machos dos grupos C ($p=0,0003$) e E ($p=0,0167$), dos machos e fêmeas do grupo D ($p<0,0001$ e $p=0,0286$), e a hipertrigliceridemia dos machos do grupo C ($p=0,0002$) e das fêmeas dos grupos G ($p=0,0091$) e D ($p=0,0095$) quando comparados com seus respectivos controles, confirmando os dados da literatura (Yagyu, Kitamine et al. 2000; Amaral, Oliveira et al. 2002). (Tabela 4)

Também podemos observar que a hipercolesterolemia e a hipertrigliceridemia dos camundongos fêmeas do grupo C foi maior que as dos camundongos machos ($p=0,0295$), e a hipercolesterolemia dos camundongos fêmeas do grupo B foi maior que a dos machos ($p=0,0060$). (Tabela 4)

Tabela 4 – Parâmetros estruturais e fisiológicos dos grupos em estudo. Os dados estão apresentados como média ± EP.

Grupos		Controle 5 meses	Controle/Hiper 5 meses	LDLRKO 5 meses	LDLRKO/Hiper 5 meses	ApoE 5 meses	Controle 9 meses	ApoCIII 9 meses
		A	B	C	D	E	F	G
Peso corpóreo (g)	macho	31,0 ± 1,1 a ∞	34,4 ± 1,0 b #	25,2 ± 1,0 c ∝	30,3 ± 0,9 d #	28,3 ± 1,0 e ∞	25,6 ± 0,5 x	31,7 ± 0,9 f x
	fêmea	21,1 ± 0,2 a ç ¥	24,8 ± 0,5 b #	20,8 ± 0,5 c	20,1 ± 0,2 d #ç	24,9 ± 1,2 e ¥	24,9 ± 1,0	25,1 ± 1,4 f
Peso da GL (g)	macho	16,7 ± 1,8 g	13,0 ± 0,7 h \$	13,1 ± 0,7 i	15,5 ± 0,5 j \$	19,4 ± 0,7 k	16,1 ± 1,5 l	17,9 ± 1,0 m
	fêmea	7,8 ± 1,1 g	7,3 ± 0,5 h	7,7 ± 0,9 i	8,0 ± 0,5 j	10,8 ± 1,5 k	6,0 ± 0,4 l	6,7 ± 0,6 m
Fenol Vermelho (mm)	macho	7 ± 1,5 ®	4 ± 0,4	4 ± 0,6	4 ± 0,9 ®	5 ± 0,4	4 ± 0,9	5 ± 1,1
	fêmea	5 ± 1,5	4 ± 0,8	6 ± 1,6	6 ± 2,1	6 ± 2,1	5 ± 1,1	6 ± 3,4
Colesterol	macho	99,7 ± 2,6 δ %	166,9 ± 7,9 @	317,9 ± 15,1 δ n	883,1 ± 78,9 @	432,3 ± 18,1 %	97 ± 4,2 ¹	117 ± 5,4 ¹
	fêmea	82 ± 1,8 ²	236,4 ± 3,8 +	376,1 ± 14,3 n	663,8 ± 66,8 +	-	-	-
Triacilglicerol	macho	60,5 ± 3,9 ©	306,4 ± 0,0	146,0 ± 14,5 © n	188,8 ± 10,6	62,3 ± 1,8	86 ± 5,5 ¹	652,7 ± 64,4
	fêmea	135 ± 2,4 ²	171,2 ± 5,2 *	195,9 ± 4,7 n	229,9 ± 11,7 *	-	65,9 ± 7,4 &	552,3 ± 86,3 &

¹ Mean ± SEM (Amaral, Oliveira et al. 2002) ; ² Mean ± SD (Aalto-Setälä, Fisher et al. 1992)

Valores de p<0,05 foram considerados significativos (Mann-Whitney U)

a p=0,0007; b p=0,0043; c p=0,0127; d p=0,0016; e p=0,0152 ; f p=0,0238; g p=0,0038; h p<0,0001; i p=0,0003; j p<0,0001; k p=0,0022; l p=0,0025;

m p=0,0116; n p= 0,0295; ∝ p=0,0030; ∞ p= 0,0266; ç p= 0,0043; # p= 0,0043; ¥ p=0,0050 x p=0,0012; \$ p=0,00299; ® p= 0,0273; δ p=0,0003;

@ p< 0,0001; + p=0,0286; % p= 0,0167; © p=0,0002; * p= 0,0095; & p= 0,0091

A análise da pelagem dos animais revelou que nos grupos B, C, H e I havia alopecia no dorso. Porém esse sinal de falha tegumentar só ocorreu em três animais de cada grupo. (Figura 3)

O exame de lâmpada de fenda mostrou que as córneas dos animais apresentaram pálpebras íntegras, bem como epitélio de córnea sem ceratite, em todos os grupos. A maioria dos camundongos fêmeas F e G (fig. 4) e C e D (fig. 5) dos grupos C e D apresentaram opacidade do cristalino.

A CI da SO não apresentou diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$). Observou-se características similares na quantidade e estrutura das células calciformes do epitélio da córnea (citoplasma e núcleo) e não houve diferença na quantidade de muco. (Figura 6)

A comparação histológica entre os animais revelou preservação das estruturas apesar da dislipidemia. A glândula lacrimal do grupo em estudo não foi prejudicada. Sua morfologia manteve-se preservada com ácinos e ductos no formato regular, distribuição similar das células e da relação núcleo/citoplasma e coloração inalterada. (Figura 7 e 8) A glândula de Meibomius não apresentou nenhuma característica de disfunção, tais como, ácinos com formato irregular, dilatação dos ductos e granulomas. (Figura 9 e 10) A córnea mostrou-se similar entre os grupos, tanto na espessura total como das camadas e também nas características e número das células epiteliais e ceratócitos. (Figura 11 e 12)



Figura 3 - Aspecto da pelagem de camundongos machos (A-F) e fêmeas (G-L) C57BL/6 (A-G), LDLRKO (B-H), LDLRKO/hiper (C-I) e ApoEKO (D-J) de 5 meses, e C57BL/6 (E-K) e ApoCIII (F-L) de 9 meses de idade. Mostrando que nos grupos LDLRKO e LDLRKO/hiper havia alopecia no dorso.

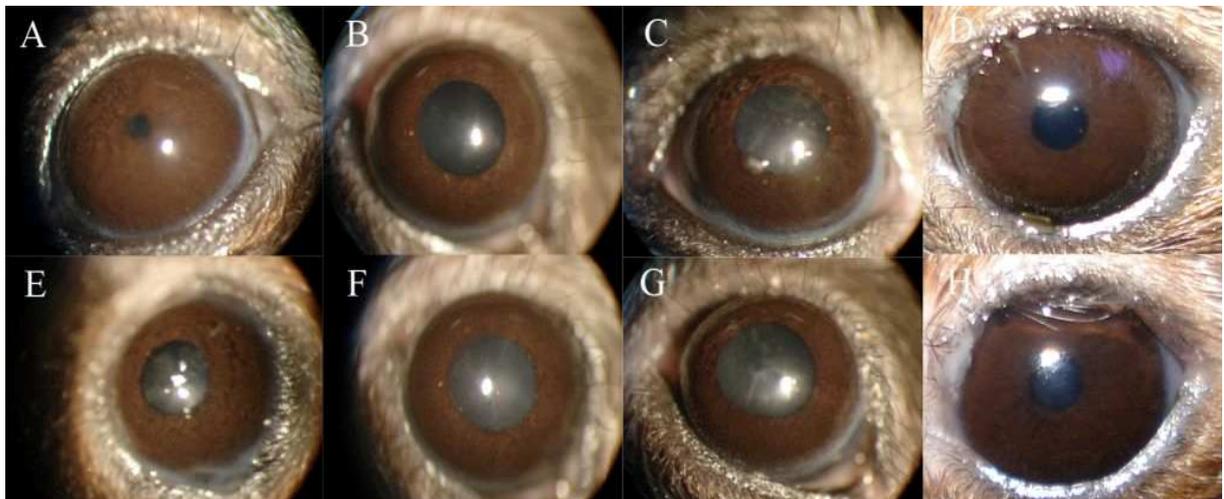


Figura 4 - Exame de lâmpada de fenda da córnea de camundongos machos (A-D) e fêmeas (E-H) C57BL/6 (A-E), LDLRKO (B-F), LDLRKO/hiper (C-G) e ApoEKO (D-H) de 5 meses de idade. Mostrando que as córneas dos animais apresentaram pálpebras íntegras.

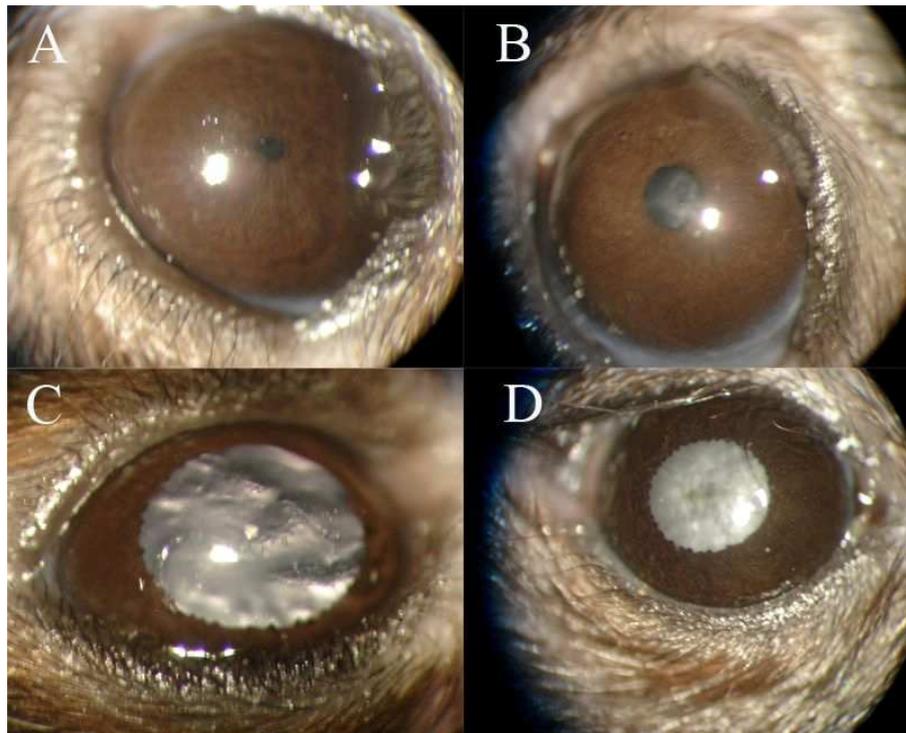


Figura 5 - Exame de lâmpada de fenda da córnea de camundongos machos (A-B) e fêmeas (C-D) C57BL/6 (A-C) e ApoCIII (B-D) de 9 meses de idade. Mostrando que a maioria dos camundongos fêmeas apresentaram opacidade do cristalino.

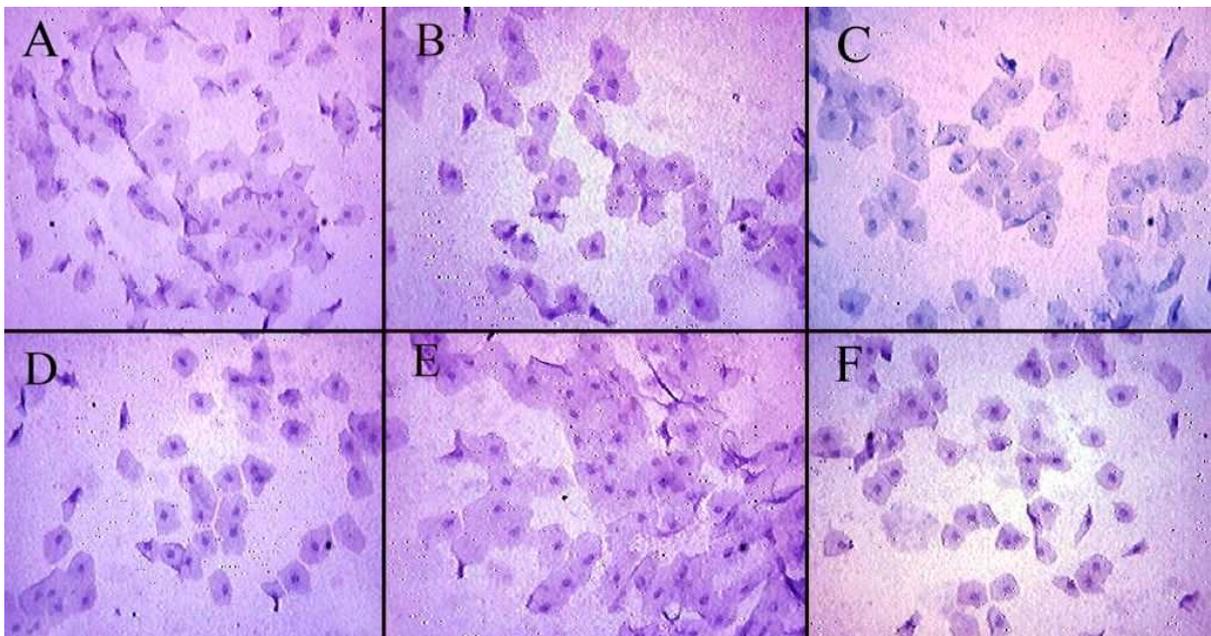


Figura 6 - Citologia de impressão da superfície ocular (SO) de camundongos machos (A-C) e fêmeas (D-F) C57BL/6 (A-D), LDLRKO (B-E), LDLRKO/hiper (C-F) de 5 meses de idade. ($P > 0.05$; Teste de Fisher) Mostrando que a SO não apresentou diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

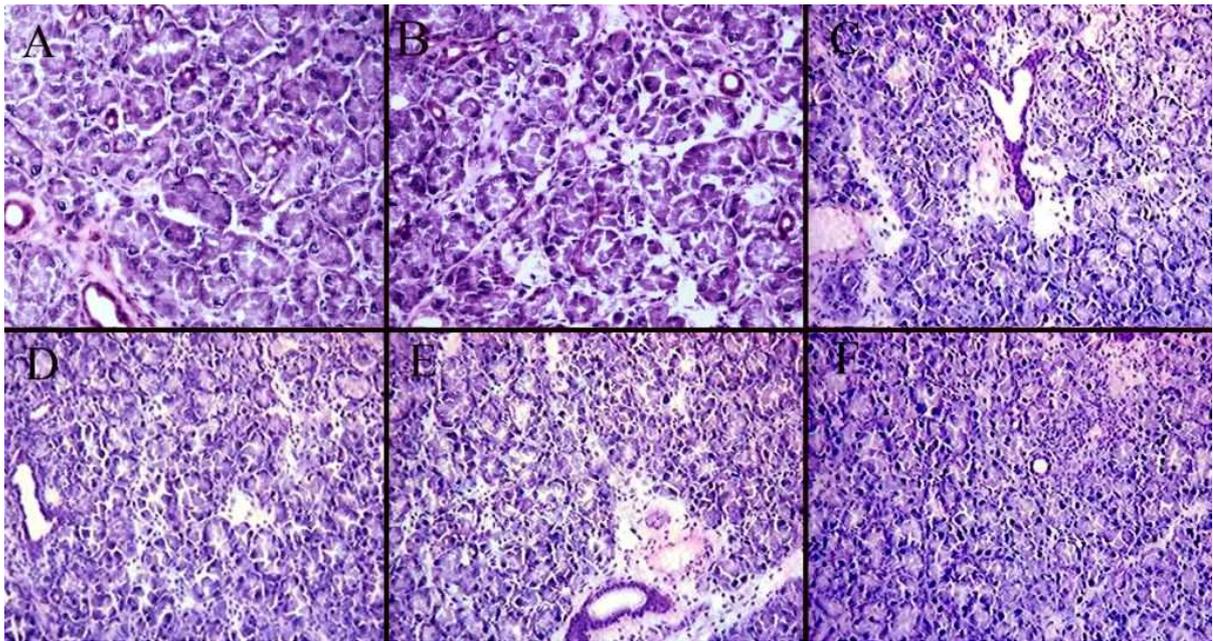


Figura 7 - Histologia da glândula lacrimal de camundongos machos (A-C) e fêmeas (D-F) C57BL/6 (A-D), LDLRKO (B-E) e LDLRKO/hiper (C-F) de 5 meses de idade. Coloração HE. Mostrando que não houve diferença entre os grupos.

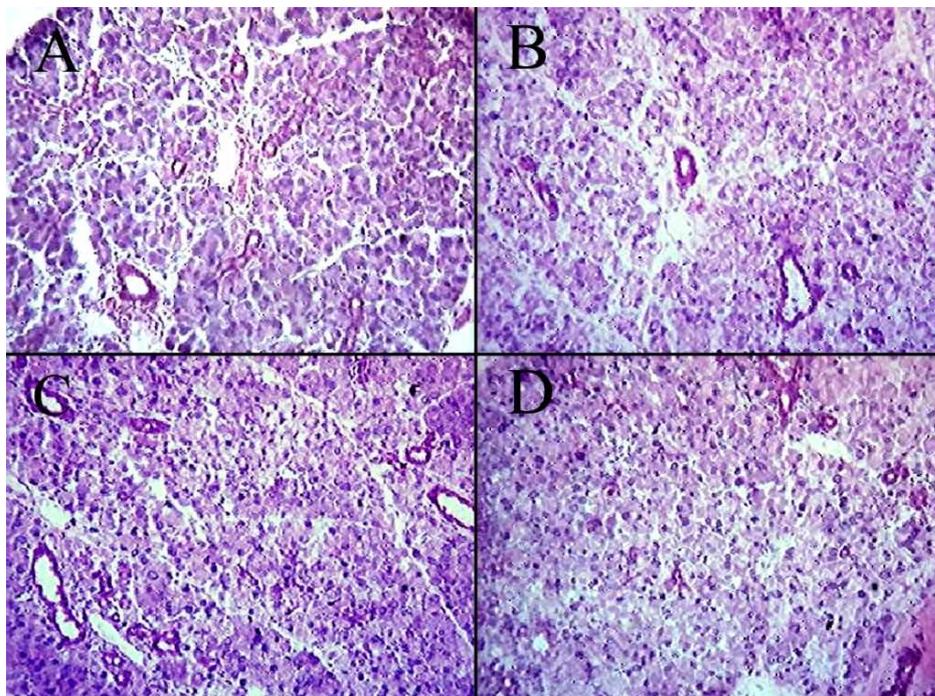


Figura 8 - Histologia da glândula lacrimal de camundongos machos (A-B) e fêmeas (C-D) C57BL/6 (A-C) e ApoCIII (B-D) de 9 meses de idade. Coloração HE. Mostrando que não houve diferença entre os grupos.

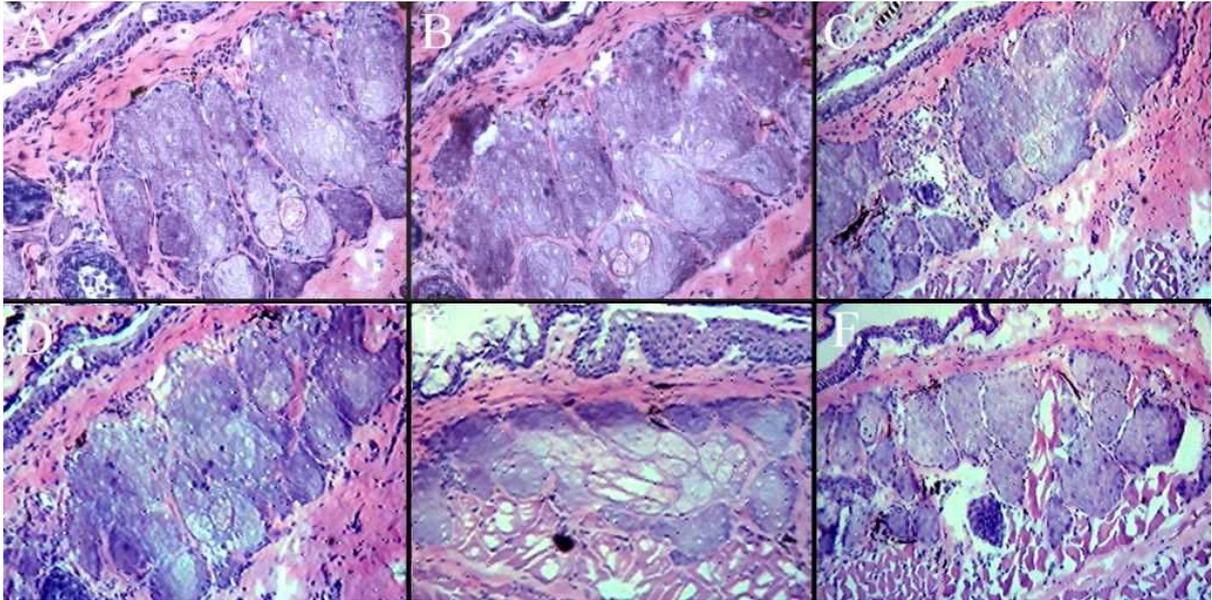


Figura 9 - Histologia da glândula de Meibomius de camundongos machos (A-C) e fêmeas (D-F) C57BL/6 (A-D), LDLRKO (B-E) e LDLRKO/hiper (C-F) de 5 meses de idade. Coloração HE. Mostrando que não houve diferença entre os grupos.

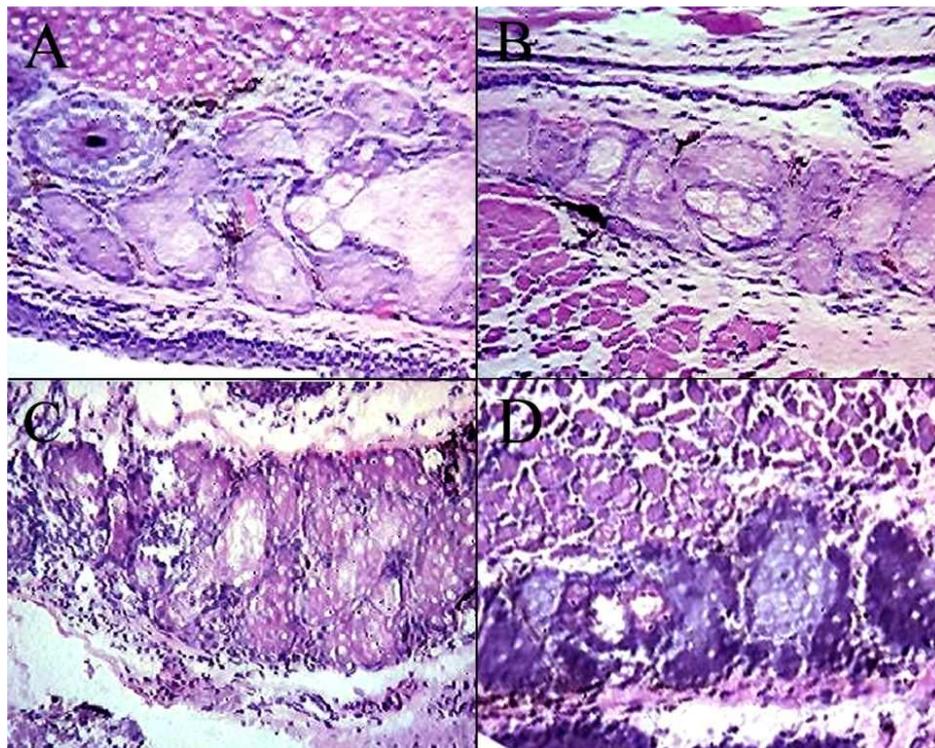


Figura 10 – Histologia da glândula de Meibomius de camundongos machos (A-B) e fêmeas (C-D) C57BL/6 (A-C) e ApoCIII (B-D) de 9 meses de idade. Coloração HE. Mostrando que não houve diferença entre os grupos.

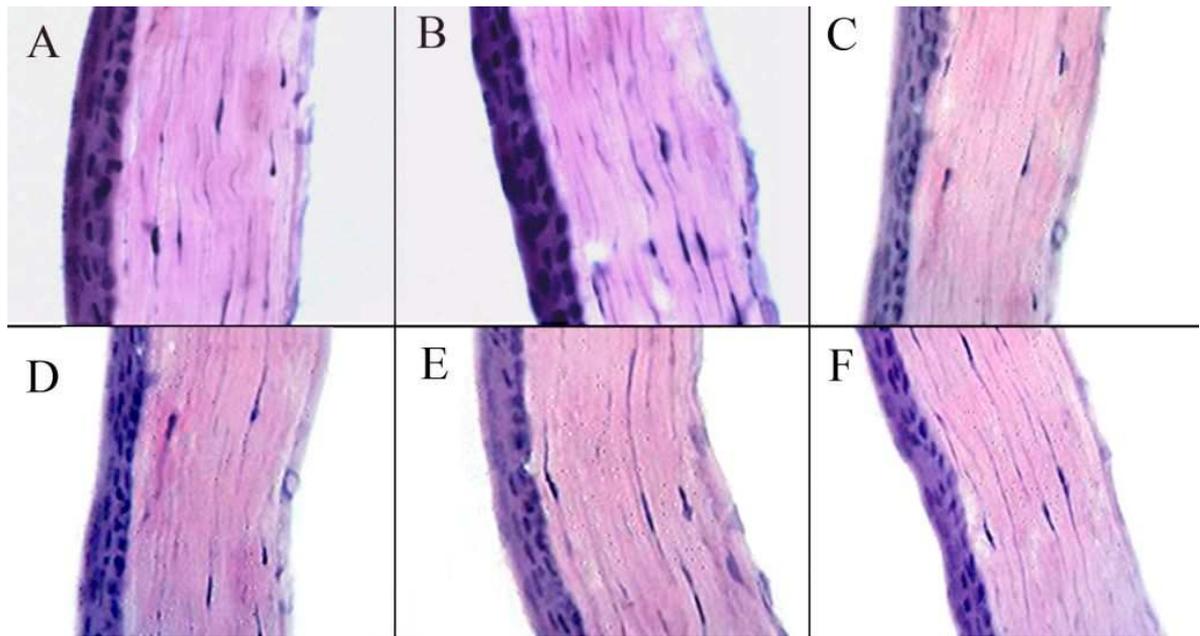


Figura 11 - Histologia da córnea de camundongos machos (A-C) e fêmeas (D-F) C57BL/6 (A-D), LDLRKO (B-E) e LDLRKO/hiper (C-F) de 5 meses de idade. Coloração HE. Mostrando que não houve diferença entre os grupos.

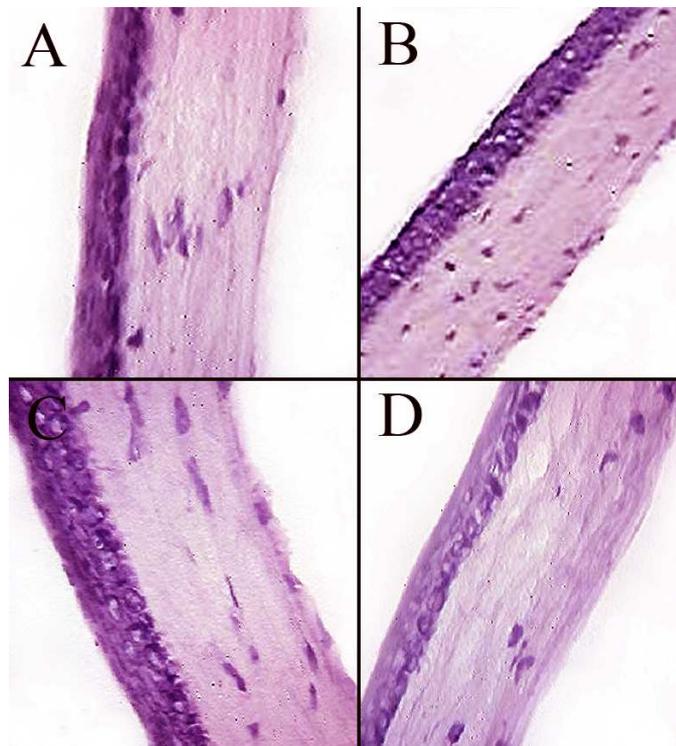
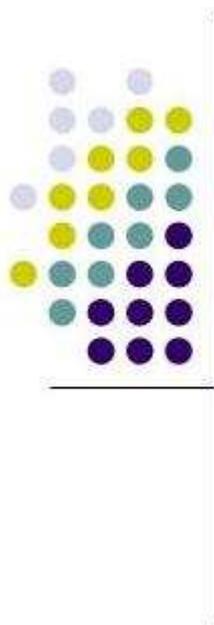


Figura 12 - Histologia da córnea de camundongos machos (A-B) e fêmeas (D-C) C57BL/6 (A-C) e ApoCIII (B-D) de 9 meses de idade. Coloração HE. Mostrando que não houve diferença entre os grupos.



DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho explora a hipótese de que certos modelos transgênicos para hiperlipidemia, os quais possuem seus níveis de lipídios e/ou lipoproteínas elevados no sangue podem danificar o conteúdo do filme lacrimal e a integridade da córnea. Embora apolipoproteínas e receptores para lipoproteínas estejam principalmente relacionadas com a captação e transporte de lipídios no sangue e a deficiência destes resulta no aumento dos níveis de lipídios, no desequilíbrio de lipoproteínas e em ateroscleroses, existem inúmeras indicações de que essas proteínas têm muitos outros papéis no metabolismo lipídico, potencialmente afetando a função dos órgãos. Por exemplo, o nocaute do ApoE induz a susceptibilidade e severidade de certas infecções virais que podem ser afetadas pelos hormônios sexuais (Hill, Bhattacharjee et al. 2007).

Trabalhos anteriores com pacientes revelaram que os níveis de ésteres de colesterol estão relacionados com doenças da glândula de Meibomius (Shine and McCulley 1991), embora as glândulas sebáceas da pele de indivíduos normais e hiperlipidêmicos tenham composição diferente, a quantidade de secreção destes animais não varia (Guldur, Bayraktar et al. 2007). Nosso trabalho revelou que camundongo hiperlipidêmico ou com altos níveis de colesterol no sangue não foi suficiente para induzir alterações no filme lacrimal, na GM ou na córnea. Diferentemente dos camundongos ACAT-1 nocautes que apresentaram atrofia das glândulas de Meibomius e aumento dos níveis de colesterol total e colesterol-HDL, mas não nos níveis de triacilglicerol (Meiner, Cases et al. 1996), (Yagy, Kitamine et al. 2000) ou a super-expressão de apolipoproteína CI que induz alterações oculares semelhantes com hiperlipidemia, os modelos atuais (i.e.; LDLRKO, LDLRKO-hiper ApoCIII e ApoEKO) não apresentaram alterações na glândula de Meibomius e na superfície ocular, apesar da hiperlipidemia prolongada.

Enzimas lipogênicas como 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) expressas nas glândulas lacrimais e de Meibomius são responsáveis pela síntese de ésteres de colesterol e são reguladas por andrógenos (Heemers, Vanderhoydonc et al. 2003), confirmando que há influência de hormônios sexuais em vários outros aspectos na secreção do filme lacrimal e também na secreção de lipídios (Rocha, Hirata et al. 2002), (Sullivan, Sullivan et al. 2002), (Schirra, Richards et al. 2007).

Apesar dessas conhecidas diferenças sexuais o estudo atual não identificou diferenças histológicas entre as glândulas de Meibomius dos grupos estudados.

Portanto, aspectos ambientais ou abordagens terapêuticas que afetam os níveis de hormônios sexuais ou a síntese de colesterol podem levar a distúrbios na secreção de lipídios nos tecidos oculares induzindo doenças na glândula de Meibomius e Harderian (Duerden and Tiffany 1990), (Sullivan, Evans et al. 2000), (Sullivan, Evans et al. 2002), (Sullivan, Evans et al. 2006).

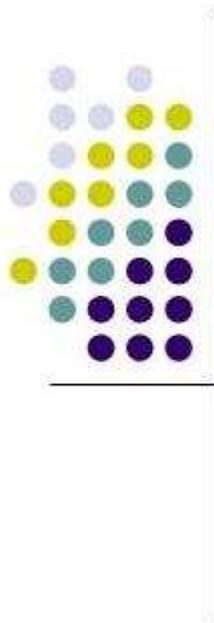
Opacidade corneana relacionada com hiperlipidemia é expressa em vários modelos transgênicos com diferentes manifestações sistêmicas e oculares (Chu, Kuwabara et al. 1979), (Carlson 1982), (Schaefer, Ordovas et al. 1985), (Winder, Garner et al. 1985). Em nosso estudo observamos essa característica nos grupos fêmeas de 9 meses C57BL/6 e ApoCIII. A deficiência de apolipoproteína AI e CIII em humanos induz opacidade corneana, diminui os níveis de HDL e parcialmente a absorção da vitamina E da dieta e dos ácidos linolêicos (Schaefer, Ordovas et al. 1985). A deficiência de colesterol aciltransferase lecitina é outro determinante genético para opacidade corneana e redução dos níveis de HDL, associado com repercussões clínicas (Winder, Garner et al. 1985).

Dieta com vitamina A é crucialmente bem conhecida para a secreção da glândula de Meibomius e integridade da superfície ocular e sua ausência pode prejudicar a visão e integridade dos olhos (Cella, Urbano et al. 2002), (Velasco Cruz, Attie-Castro et al. 2005). Nos últimos anos, aumentaram as evidências de que a vitamina E e ácidos graxos essenciais como ômega -3 são responsáveis pela atividade antiinflamatória e/ou anti-oxidante para a glândula de Meibomius e sua secreção de característica lipídica para o filme lacrimal é usada como estratégia terapêutica já preconizada demonstrando sua importância para o bom funcionamento do filme lacrimal (Alexander 1998), (Peponis, Papathanasiou et al. 2002), (Rashid, Jin et al. 2008).

As anormalidades lipídicas são claramente diferentes e os mecanismos que influenciam nos diversos aspectos da superfície ocular e filme lacrimal não são bem conhecidos (Chu, Kuwabara et al. 1979), (Carlson 1982), (Winder, Garner et al. 1985). Neste trabalho, embora diferentes alterações genéticas por si só levem a hiperlipidemia, a córnea, glândula lacrimal e de Meibomius e o filme lacrimal não foram afetados nos parâmetros estruturais e funcionais.

Embora alguns animais tenham apresentado alopecia, as causas para este evento é bem discutida. Sabemos que alimentação muito oleosa e/ou déficit vitamínico podem levar a queda de pêlos. Neste trabalho, camundongos controles também apresentaram alopecia, contudo acreditamos que um dos motivos seja devido aos atritos entre eles para dominar o território.

O presente estudo concluiu que o perfil da dieta associado ao aspecto genético e o sexo masculino tem impacto funcional na glândula lacrimal. Sugerindo que a dislipidemia por si só não determina o acúmulo lipídico tecidual ou anormalidades das secreções nos tecidos da superfície ocular. Isso confirma a hipótese de que a biossíntese local não é estritamente dependente do sistema de transporte lipídico.



CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A.** O peso corpóreo foi menor nos machos e fêmeas LDLRKO-hiper em relação aos seus respectivos controles e o peso da glândula lacrimal foi maior nos machos LDLRKO-hiper em relação aos seus respectivos controles. O peso corpóreo e da glândula lacrimal foi maior em todos os machos dos grupos estudados;
- B.** Houve redução significativa na secreção lacrimal no grupo de machos LDLRKO tratados com dieta hiperlipídica quando comparados aos controles que receberam dieta normal;
- C.** A comparação histológica da GL, GM e córnea entre os animais revelou preservação das estruturas apesar da dislipidemia.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. (2007). "The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007)." Ocul Surf **5**(2): 75-92.
2. Aalto-Setälä, K., E. A. Fisher, et al. (1992). "Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles." J Clin Invest **90**(5): 1889-900.
3. Alexander, J. W. (1998). "Immunonutrition: the role of omega-3 fatty acids." Nutrition **14**(7-8): 627-33.
4. Alves, M., D. A. Cunha, et al. (2005). "Nuclear factor-kappaB and advanced glycation end-products expression in lacrimal glands of aging rats." J Endocrinol **187**(1): 159-66.
5. Amaral, M. E., H. C. Oliveira, et al. (2002). "Plasma glucose regulation and insulin secretion in hypertriglyceridemic mice." Horm Metab Res **34**(1): 21-6.
6. Avramoglu, R. K., H. Basciano, et al. (2006). "Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states." Clin Chim Acta **368**(1-2): 1-19.
7. Bandeen-Roche, K., B. Munoz, et al. (1997). "Self-reported assessment of dry eye in a population-based setting." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(12): 2469-75.
8. Barabino, S., *Animal models of dry eye*. Arch Soc Esp Oftalmol, 2005. **80**(12): p. 693-4; 695-6.
9. Berti, J. A., E. C. de Faria, et al. (2005). "Atherosclerosis in aged mice over-expressing the reverse cholesterol transport genes." Braz J Med Biol Res **38**(3): 391-8.
10. Bromberg, B. B. and M. H. Welch (1985). "Lacrimal protein secretion: comparison of young and old rats." Exp Eye Res **40**(2): 313-20.
11. Bron, A. J., J. M. Tiffany, et al. (2004). "Functional aspects of the tear film lipid layer." Exp Eye Res **78**(3): 347-60.

12. Bron, A. J., R. C. Tripathi, et al. (1997). Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit. London, Chapman & Hall Medical.
13. Calandra, S. and S. Bertolinio (1999). "Unusual inheritance of severe primary hypercholesterolemia." Atherosclerosis **144**(2): 464-6.
14. Carlson, L. A. (1982). "Fish eye disease: a new familial condition with massive corneal opacities and dyslipoproteinaemia." Eur J Clin Invest **12**(1): 41-53.
15. Cella, W., A. P. Urbano, et al. (2002). "Xerophthalmia secondary to short bowel syndrome." J Pediatr Ophthalmol Strabismus **39**(2): 125-7.
16. Chu, F. C., T. Kuwabara, et al. (1979). "Ocular manifestations of familial high-density lipoprotein deficiency (Tangier disease)." Arch Ophthalmol **97**(10): 1926-8.
17. Davignon, J., Gregg, R.E. , Sing, C.F. (1988). "Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis." Arteriosclerosis **8**: 1-21.
18. Dergunov, A. D., Rosseneu, M. (1994). "The significance of apolipoprotein and structure of plasma triglyceride-rich lipoproteins." Biol Chem Hoppe - Seyler **375**: 485-495.
19. Dias, A. C., C. M. Modulo, et al. (2007). "Influence of thyroid hormone on thyroid hormone receptor beta-1 expression and lacrimal gland and ocular surface morphology." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(7): 3038-42.
20. Duerden, J. M. and J. M. Tiffany (1990). "Lipid synthesis in vitro by rabbit Meibomian gland tissue and its inhibition by tetracycline." Biochim Biophys Acta **1042**(1): 13-8.
21. Faria e Souza, S. J., A. C. O. Romano, et al. (2006). Anatomia Funcional da Superfície Ocular. Superfície Ocular. J. A. P. Gomes and M. R. Alves. Rio de Janeiro, Cultura Médica: 3-13.
22. Gent J , B. I. (2004). "Low density lipoprotein receptor structure and folding." Cell Mol Life Sci **61**(19-20): 2461-2470.

23. Goebbels, M. (2000). "Tear secretion and tear film function in insulin dependent diabetics." Br J Ophthalmol **84**(1): 19-21.
24. Goldstein JL, H. H., Brow MS. (2001). Familial hypercholesterolemia. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed New York. Mac Graw-Hill. **2**: 2863-2913
25. Grundy, S. (1990). *Lipid Disorders. Dietary Therapy of Hyperlipidemia*. Gower Medical Publishing. New York.
26. Guldur, T., N. Bayraktar, et al. (2007). "Excretion rate and composition of skin surface lipids on the foreheads of adult males with type IV hyperlipoproteinemia." J Basic Clin Physiol Pharmacol **18**(1): 21-35.
27. Gupta, A., D. Monroy, et al. (1996). "Transforming growth factor beta-1 and beta-2 in human tear fluid." Curr Eye Res **15**(6): 605-14.
28. Hann, L. E., R. S. Kelleher, et al. (1991). "Influence of culture conditions on the androgen control of secretory component production by acinar cells from the rat lacrimal gland." Invest Ophthalmol Vis Sci **32**(9): 2610-21.
29. Heemers, H., F. Vanderhoydonc, et al. (2003). "Androgens stimulate coordinated lipogenic gene expression in normal target tissues in vivo." Mol Cell Endocrinol **205**(1-2): 21-31.
30. Henkin Y, C. J., Oberman A. (1992). "Secondary dyslipidemias. Inadvertent effects of drugs in clinical practice." JAMA **267**: 961-968.
31. Hill, J. M., P. S. Bhattacharjee, et al. (2007). "Apolipoprotein E alleles can contribute to the pathogenesis of numerous clinical conditions including HSV-1 corneal disease." Exp Eye Res **84**(5): 801-11.
32. Huang, F. C., S. H. Tseng, et al. (2002). "Effect of artificial tears on corneal surface regularity, contrast sensitivity, and glare disability in dry eyes." Ophthalmology **109**(10): 1934-40.
33. Ishibashi, S., M. S. Brown, et al. (1993). "Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery." J Clin Invest **92**(2): 883-93.

34. Ito, Y., N. Azrolan, et al. (1990). "Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice." Science **249**(4970): 790-3.
35. Jeanpierre, M., D. Weil, et al. (1984). "Gene for apolipoprotein CII is on human chromosome 19." Somat Cell Mol Genet **10**(6): 645-9.
36. Jong, M. C., M. J. Gijbels, et al. (1998). "Hyperlipidemia and cutaneous abnormalities in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1." J Clin Invest **101**(1): 145-52.
37. Jorge, A. G., C. M. Modulo, et al. (2009). "Aspirin prevents diabetic oxidative changes in rat lacrimal gland structure and function." Endocrine.
38. Kinoshita, S., W. Adachi, et al. (2001). "Characteristics of the human ocular surface epithelium." Prog Retin Eye Res **20**(5): 639-73.
39. Krenzer, K. L., M. R. Dana, et al. (2000). "Effect of androgen deficiency on the human meibomian gland and ocular surface." J Clin Endocrinol Metab **85**(12): 4874-82.
40. Krummel, D. (1998). Krause Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. Nutrição na Doença Cardiovascular. Roca. São Paulo: 526-567.
41. Lee, A. J., J. Lee, et al. (2002). "Prevalence and risk factors associated with dry eye symptoms: a population based study in Indonesia." Br J Ophthalmol **86**(12): 1347-51.
42. Lemp, M. A. (1995). "Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes." Clao J **21**(4): 221-32.
43. Lemp, M. A. (1998). "Epidemiology and classification of dry eye." Adv Exp Med Biol **438**: 791-803.
44. Lin-Lue, Y. C., Kao, F.T. , Cheung, P. , Chan, L. (1985). "Apolipoprotein E gene mapping and expression: localization of the structural gene to human chromosome 19 and expression of apo E mRNA in lipoprotein and non-lipoprotein producing tissues." Biochemistry **24**(14): 3751-3756.

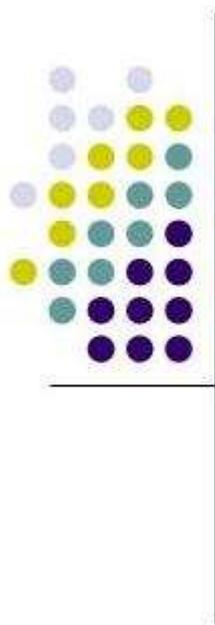
45. Lin, P. Y., C. Y. Cheng, et al. (2005). "Association between symptoms and signs of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan: the Shihpai Eye Study." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(5): 1593-8.
46. Mahley RW, W. K., Farese RV Jr. (2006). Disorder of Lipid Metabolism Willians Wtbook of Endocrinology 1642-1705.
47. Manis, J. P. (2007). "Knock out, knock in, knock down--genetically manipulated mice and the Nobel Prize." N Engl J Med **357**(24): 2426-9.
48. Masucci-Magoulas, L., I. J. Goldberg, et al. (1997). "A mouse model with features of familial combined hyperlipidemia." Science **275**(5298): 391-4.
49. McCarty, C. A., A. K. Bansal, et al. (1998). "The epidemiology of dry eye in Melbourne, Australia." Ophthalmology **105**(6): 1114-9.
50. Meiner, V. L., S. Cases, et al. (1996). "Disruption of the acyl-CoA:cholesterol acyltransferase gene in mice: evidence suggesting multiple cholesterol esterification enzymes in mammals." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 14041-6.
51. 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.
52. Moss, S. E., R. Klein, et al. (2000). "Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome." Arch Ophthalmol **118**(9): 1264-8.
53. Moss, S. E., R. Klein, et al. (2004). "Incidence of dry eye in an older population." Arch Ophthalmol **122**(3): 369-73.
54. Nelson, J. D. (1982). "Ocular surface impressions using cellulose acetate filter material. Ocular pemphigoid." Surv Ophthalmol **27**(1): 67-9.
55. Ohashi, Y., M. Motokura, et al. (1989). "Presence of epidermal growth factor in human tears." Invest Ophthalmol Vis Sci **30**(8): 1879-82.
56. Peponis, V., M. Papathanasiou, et al. (2002). "Protective role of oral antioxidant supplementation in ocular surface of diabetic patients." Br J Ophthalmol **86**(12): 1369-73.

57. Pflugfelder, S. C. (1998). "Tear fluid influence on the ocular surface." Adv Exp Med Biol **438**: 611-7.
58. Pflugfelder, S. C., A. Solomon, et al. (2000). "The diagnosis and management of dry eye: a twenty-five-year review." Cornea **19**(5): 644-9.
59. Plump AS, S. J., Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL (1992). "Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. ." Cell **71**: 343-353.
60. 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.
61. Rashid, S., Y. Jin, et al. (2008). "Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye." Arch Ophthalmol **126**(2): 219-25.
62. Rieger, G. (1992). "The importance of the precorneal tear film for the quality of optical imaging." Br J Ophthalmol **76**(3): 157-8.
63. Rocha, E. M., M. Alves, et al. (2008). "The Aging Lacrimal Gland: Changes in Structure and Function." Ocul Surf **6**(4): 162-174.
64. Rocha, E. M., C. R. Carvalho, et al. (2003). "The influence of ageing on the insulin signalling system in rat lacrimal and salivary glands." Acta Ophthalmol Scand **81**(6): 639-45.
65. Rocha, E. M., D. A. Cunha, et al. (2002). "Identification of insulin in the tear film and insulin receptor and IGF-1 receptor on the human ocular surface." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(4): 963-7.
66. Rocha, E. M., M. L. M. H. de, et al. (2000). "Characterization of the insulin-signaling pathway in lacrimal and salivary glands of rats." Curr Eye Res **21**(5): 833-42.
67. Rocha, E. M., A. E. Hirata, et al. (2002). "Impact of gender on insulin signaling pathway in lacrimal and salivary glands of rats." Endocrine **18**(2): 191-9.

68. Rocha, E. M., L. A. Wickham, et al. (2000). "Identification of androgen receptor protein and 5alpha-reductase mRNA in human ocular tissues." Br J Ophthalmol **84**(1): 76-84.
69. Schaefer, E. J., J. M. Ordovas, et al. (1985). "Familial apolipoprotein A-I and C-III deficiency, variant II." J Lipid Res **26**(9): 1089-101.
70. Schaumberg, D. A., J. E. Buring, et al. (2001). "Hormone replacement therapy and dry eye syndrome." Jama **286**(17): 2114-9.
71. Schaumberg, D. A., D. A. Sullivan, et al. (2003). "Prevalence of dry eye syndrome among US women." Am J Ophthalmol **136**(2): 318-26.
72. Schaumberg, D. A., D. A. Sullivan, et al. (2002). "Epidemiology of dry eye syndrome." Adv Exp Med Biol **506**(Pt B): 989-98.
73. Schein, O. D., B. Munoz, et al. (1997). "Prevalence of dry eye among the elderly." Am J Ophthalmol **124**(6): 723-8.
74. Schein, O. D., J. M. Tielsch, et al. (1997). "Relation between signs and symptoms of dry eye in the elderly. A population-based perspective." Ophthalmology **104**(9): 1395-401.
75. Schirra, F., S. M. Richards, et al. (2007). "Androgen influence on cholesterologenic enzyme mRNA levels in the mouse meibomian gland." Curr Eye Res **32**(5): 393-8.
76. Schutt, F., M. Bergmann, et al. (2003). "Proteins modified by malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, or advanced glycation end products in lipofuscin of human retinal pigment epithelium." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(8): 3663-8.
77. Seifart, U. and I. Stempel (1994). "The dry eye and diabetes mellitus." Ophthalmologie **91**(2): 235-9.
78. Shimmura, S., J. Shimazaki, et al. (1999). "Results of a population-based questionnaire on the symptoms and lifestyles associated with dry eye." Cornea **18**(4): 408-11.

79. Shine, W. E. and J. P. McCulley (1991). "The role of cholesterol in chronic blepharitis." Invest Ophthalmol Vis Sci **32**(8): 2272-80.
80. Sreebny, L. M. (1989). "Salivary flow in health and disease." Compend Suppl(13): S461-9.
81. Sullivan, B. D., J. E. Evans, et al. (2002). "Complete androgen insensitivity syndrome: effect on human meibomian gland secretions." Arch Ophthalmol **120**(12): 1689-99.
82. Sullivan, B. D., J. E. Evans, et al. (2006). "Influence of aging on the polar and neutral lipid profiles in human meibomian gland secretions." Arch Ophthalmol **124**(9): 1286-92.
83. Sullivan, B. D., J. E. Evans, et al. (2000). "Impact of antiandrogen treatment on the fatty acid profile of neutral lipids in human meibomian gland secretions." J Clin Endocrinol Metab **85**(12): 4866-73.
84. Sullivan, D. A. (1997). "Sex hormones and Sjogren's syndrome." J Rheumatol Suppl **50**: 17-32.
85. Sullivan, D. A. and L. E. Hann (1989). "Hormonal influence on the secretory immune system of the eye: endocrine impact on the lacrimal gland accumulation and secretion of IgA and IgG." J Steroid Biochem **34**(1-6): 253-62.
86. Sullivan, D. A., E. M. Rocha, et al. (1998). "Androgen regulation of the meibomian gland." Adv Exp Med Biol **438**: 327-31.
87. Sullivan, D. A., B. D. Sullivan, et al. (2002). "Androgen deficiency, Meibomian gland dysfunction, and evaporative dry eye." Ann N Y Acad Sci **966**: 211-22.
88. Tiffany, J. M. (1995). "Physiological Functions of the Meibomian Glands." Prog Retin Eye Res **14**(1): 47-74.
89. Toda, I., B. D. Sullivan, et al. (1999). "Impact of gender on exocrine gland inflammation in mouse models of Sjogren's syndrome." Exp Eye Res **69**(4): 355-66.

90. Tseng, S. C. and K. Tsubota (1997). "Important concepts for treating ocular surface and tear disorders." Am J Ophthalmol **124**(6): 825-35.
91. Ubels, J. L., T. H. Sulahian, et al. (1997). "The lacrimal gland expresses nuclear retinoid X receptors." Curr Eye Res **16**(5): 511-5.
92. van Haeringen, N. J. and E. Glasius (1975). "Cholesterol in human tear fluid." Exp Eye Res **20**(3): 271-4.
93. Velasco Cruz, A. A., F. A. Attie-Castro, et al. (2005). "Adult blindness secondary to vitamin A deficiency associated with an eating disorder." Nutrition **21**(5): 630-3.
94. Watanabe, H. (2002). "Significance of mucin on the ocular surface." Cornea **21**(2 Suppl 1): S17-22.
95. Winder, A. F., A. Garner, et al. (1985). "Familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. Biochemistry of the cornea." J Lipid Res **26**(3): 283-7.
96. Yagyu, H., T. Kitamine, et al. (2000). "Absence of ACAT-1 attenuates atherosclerosis but causes dry eye and cutaneous xanthomatosis in mice with congenital hyperlipidemia." J Biol Chem **275**(28): 21324-30.
97. Zoukhri, D. (2006). "Effect of inflammation on lacrimal gland function." Exp Eye Res **82**(5): 885-98.



ANEXO

1. Certificado de aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

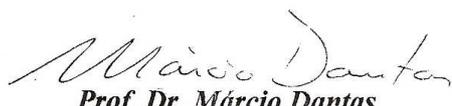


CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 024/2008, sobre o projeto intitulado “*Papel da dislipidemia na estrutura e função da glândula lacrimal, glândula de meibomius e superfície ocular em camundongos*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Eduardo Melani Rocha**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **28 de abril de 2008**.

(We certify that the protocol nº 024/2008, about “*Role of dislipidemia in lacrimal gland structure and function, meibomian gland and ocular surface in mice*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in **04/28/2008** meeting).

Ribeirão Preto, 05 de maio de 2008.


Prof. Dr. Márcio Dantas

Vice-Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

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](#)