

*MÔNICA DE CÁSSIA ALVES*

**AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS FINAIS DE  
GLICOSILAÇÃO E O FATOR NUCLEAR K-B EM  
GLÂNDULAS LACRIMAIS E SUPERFÍCIE OCULAR DE  
MODELOS ANIMAIS DE DIABETES E  
ENVELHECIMENTO**

*CAMPINAS*

*2006*

*MÔNICA DE CÁSSIA ALVES*

**AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS FINAIS DE  
GLICOSILAÇÃO E O FATOR NUCLEAR K-B EM  
GLÂNDULAS LACRIMAIS E SUPERFÍCIE OCULAR DE  
MODELOS ANIMAIS DE DIABETES E  
ENVELHECIMENTO**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas obtenção do Título de Doutor em  
Clínica Médica, área de concentração em Clínica Médica*

***ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO MELANI ROCHA***

***CAMPINAS***

***2006***

**Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado**

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

**Membros:**

- 1. Carlos Eduardo Leite Arieta**
- 2. Eduardo Melani Rocha**
- 3. José Barreto Cavalheira**
- 4. Milton Ruiz Alves**
- 5. Paulo Schor**

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

**Data: 21 de julho de 2006**

***DEDICATÓRIA***

Ao Erich, minha metade essencial.

## **AGRADECIMENTOS**

---

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha, pelo exemplo correto, simples e valiosíssimo que sigo com tanto orgulho e pela dedicação e grandiosidade na orientação desse estudo, em todos os momentos.

Erich pelo amor, cuidado e cumplicidade.

Por fazerem a minha vida mais lúdica e doce: Theo e Lia.

Aos meus pais, Maria e Manoel e também Regina e Adelgício e nossas grandes famílias.

Dr. Simão Raskin e Dr. David Raskin, pelo apoio e incentivo.

Prof. Dr. Milton Ruiz Alves, pelo conhecimento sempre compartilhado e por iluminar as minhas decisões.

Prof. Dr. Mário Saad e Prof. Dr. Lício Velloso, por cultivarem um ambiente de pesquisa, amizade e companheirismo no Laboratório de Fisiopatologia Médica por me permitirem fazer parte dele.

Prof. Everardo Carneiro, Prof. Antônio Carlos Boschero e amigos do Instituto de Biologia, pelos diversos experimentos compartilhados.

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini e amigos do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular.

Valiosos colaboradores: Daniel Andrade Cunha, Vivian Calegari, Priscilla de Paula, Luis Janeri, Eduardo Raskin, Luiz Gagliardi, Daniel Gadioli, Karla Oda, Daniela Alberto-Cruzara e Antônio Calixto.

Aos amigos do Laboratório de Fisiopatologia Médica: Mirian Ueno, Eliana Araújo, Patrícia Prada, Patty Karol, Henrique Gottardelo, José Barreto Carvalheira, Marco Antônio Carvalho, Raquel Oliveira, Eli Mansur e Cláudio Teodoro Souza.

E aos meus amigos do coração que me encantam a vida...

	<i><b>Pág.</b></i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xxxiii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xxxvii</i>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	41
<b>1.1. Superfície ocular e filme lacrimal</b> .....	43
<b>1.2. Olho seco</b> .....	45
<b>1.3. Insulina e superfície ocular</b> .....	47
<b>1.4. Diabetes Mellitus</b> .....	49
<b>1.5. Envelhecimento</b> .....	51
<b>1.6. AGEs</b> .....	52
1.6.1. Formação dos AGEs.....	52
1.6.2. AGEs e proteínas.....	54
1.6.3. AGEs e lípides.....	55
1.6.4. AGEs e ácidos nucleicos.....	55
1.6.5. RAGE .....	56
1.6.6. Metabolismo dos AGEs .....	57
1.6.7. Conseqüências do acúmulo de AGEs.....	57

1.6.8. AGEs e o olho.....	58
1.6.9. Inibidores de AGEs.....	58
<b>1.7. NF-<math>\kappa</math>B.....</b>	<b>59</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>65</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>69</b>
3.1. Modelos animais.....	71
3.2. Reagentes.....	71
3.3. Determinação da glicemia sérica.....	72
3.4. Teste de tolerância à insulina (kITT) .....	72
3.5. Determinação do volume lacrimal e concentração de $IL1\beta$ e $TNF-\alpha$ na lágrima.....	72
3.6. Atividade de peroxidase.....	73
3.7. Soluções utilizadas nos experimentos.....	73
3.8. Fracionamento subcelular.....	75
3.9. “Western blot”.....	76
3.10. Imuno-histoquímica.....	78
3.11. Análise estatística.....	79
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
4.1. Volume lacrimal e concentração de $IL1\beta$ e $TNF-\alpha$ e atividade de peroxidase.....	83

<b>4.2. Expressão de NF-<math>\kappa</math>B.....</b>	<b>86</b>
<b>4.3. Localização imuno-histoquímica dos AGEs, NF-<math>\kappa</math>B e RAGE.....</b>	<b>88</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>101</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>105</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>125</b>
<b>Anexo 1-</b> Alves M, Calegari VC, Cunha DA, Saad MJA, Velloso LA, Rocha EM. Increasead expression of Advanced Glycation End-products and their receptor, and activation of Nuclear Factor kappaB in lacrimal glands of diabetic rats. Diabetologia 2005;48:2675-81.....	127
<b>Anexo 2-</b> Alves M, Cunha DA, Calegari, VC, Saad MJA, Boschero AC, Velloso LA, Rocha EM. Nuclear Fator- $\kappa$ B and advanced glycation end-products expression in lacrimal glands of aging rats. Journal of Endocrinology 2005;187:159-166.....	137



## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

<b>AGEs</b>	“Advanced Glycation End-products”, produtos finais de glicosilação avançada
<b>AGE-R1</b>	“Advanced Glycation End-products Receptor 1”
<b>AGE-R2</b>	“Advanced Glycation End-products Receptor 2”
<b>AGE-R3</b>	“Advanced Glycation End-products Receptor 3”
<b>° C</b>	Grau Celsius
<b>CA</b>	Califórnia
<b>CEL</b>	Carboxi-etil-lisina
<b>Ci</b>	Curie (unidade de radioatividade, $3,70 \times 10^{10}$ desintegrações $s^{-1}$ )
<b>CML</b>	Carboxi-metil-lisina
<b>Da</b>	Dalton (peso molecular de um átomo de hidrogênio, $1,66 \times 10^{-24}$ g)
<b>3-DG</b>	3 deoxiglicose
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	Ácido etileno-diamino-tetra acético
<b>EGF</b>	“Epidermal Growth Factor”
<b>EGFR</b>	“Epidermal Growth Factor Receptor”
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FITC</b>	Isocianato de fluoresceína

<b>g</b>	grama, precedida pela notações de ordem de grandeza do sistema internacional de unidades; p-pico ( $10^{-12}$ ), n-nano ( $10^{-9}$ ), $\mu$ -micro ( $10^{-6}$ ), m-mili ( $10^{-3}$ ), K-kilo ( $10^3$ )
<b>g</b>	força gravitacional
<b>GL</b>	Glândula lacrimal
<b>GLUT</b>	“Glucose Transporter”
<b>IGF-1</b>	“Insulin-like Growth Factor 1”
<b>IGF-IR</b>	Receptor do “Insulin-like Growth Factor”
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	“Inhibitor $\kappa$ B”
<b>IKK</b>	“Inhibitor $\kappa$ B Kinase”
<b>IL</b>	Illinois
<b>IL1-<math>\beta</math></b>	Interleucina 1- $\beta$
<b>IRS1</b>	“ insulin receptor substrate 1”
<b>IRS2</b>	“insulin receptor substrate 2”
<b>IRS3</b>	“insulin receptor substrate 3”
<b>ITT</b>	Teste de tolerância à insulina
<b>kITT</b>	Tangente do ângulo de decaimento da curva glicêmica em resposta à insulina
<b>l</b>	litros; precedida pelas notações de ordem de grandeza do sistema internacional de unidades; $\mu$ -micro, m-mili

<b>M</b>	Molar; precedida pelas notações de ordem de grandeza do sistema internacional de unidades; p-pico, n-nano, $\mu$ -micro
<b>MAPK</b>	“mitogen-activated protein kinase”
<b>MD</b>	Maryland
<b>MGO</b>	metilglioxal
<b>MO</b>	Missouri
<b>n</b>	número de amostras ou animais utilizados no experimento
<b>N</b>	Concentração normal
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	“Nuclear Factor- $\kappa$ B”, Fator Nuclear- $\kappa$ B
<b>NGF</b>	“Nerve Growth Factor”
<b>NJ</b>	Nova Jersey
<b>NY</b>	Nova York
<b>nm</b>	nanômetros
<b>OST 48</b>	oligosacaridil transferase 48
<b>P</b>	Probabilidade associada à ocorrência sob a hipótese nula ( $H_0$ ) de um valor tão extremo quanto o valor mais extremo observado
<b>pH</b>	$-\log$ da concentração $H^+$
<b>PI3K</b>	“Phosphoinositide-3 kinase”
<b>PMSF</b>	Fenil-metil-sulfonil fluoreto
<b>RAGE</b>	Receptor de AGE

<b>RI</b>	receptor de insulina
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>SDS</b>	Sódio dodecil sulfato
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	“Transforming Growth Factor- $\beta$ ”
<b>Temed</b>	Tetrametil-etilenodiamina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	“Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ”
<b>t<sup>1/2</sup></b>	Tempo médio
<b>VEGF</b>	“Vascular Endothelial Growth Factor”

	<i>Pág.</i>
<b>Tabela 1-</b> Efeito do DM, 10 semanas após indução com estreptozotocina em ratos Wistar machos nos níveis de glicose sérica (mg/dl), peso corporal (g), peso da GL (mg), volume basal de lágrima ( $\mu$ l) de animais diabéticos e controles.....	84
<b>Tabela 2-</b> Efeito do DM, 10 semanas após indução com estreptozotocina em ratos Wistar machos na concentração de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ (pg/ml) na lágrima e atividade de peroxidase ( $\text{min}^{-1}$ ) ( $\mu$ l) na GL de animais diabéticos e controles.....	84
<b>Tabela 3-</b> Efeito da senilidade em ratos Wistar machos, teste de tolerância à insulina - kITT, peso corporal (g), peso da GL (mg), volume basal de lágrima ( $\mu$ l), de animais senis e adultos jovens.....	85
<b>Tabela 4-</b> Efeito da senilidade em ratos Wistar machos na concentração de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ (pg/ml) na lágrima, atividade de peroxidase ( $\text{min}^{-1}$ ) ( $\mu$ l) na GL de animais senis e controles.....	85

- Figura 1-** Vias de sinalização da insulina. Representação esquemática da ligação da insulina ao seu receptor (RI) induzindo a ativação deste e a subsequente ativação de vias de sinalização citoplasmáticas, dirigidas à atividade metabólica – via IRS, PI3K e GLUT 4, e nuclear para transcrição gênica e controle de proliferação celular – via MAPK..... 48
- Figura 2-** Formação de AGEs. Reações entre a terminação carbonil de açúcares com grupamento amino de proteínas e lípidos, através das reações com a glicose, da via poliol e peroxidação de lípidos. Formação de produtos iniciais e intermediários denominados bases Schiff e produtos de Amadori, respectivamente, de natureza reversível e, posteriormente, produtos finais estáveis e irreversíveis, os AGEs..... 53
- Figura 3-** Vias de ativação do NF- $\kappa$ B. Representação esquemática da translocação nuclear da molécula de NF- $\kappa$ B ativada frente diversos estímulos como hiperglicemia, “stress” oxidativo, infecção, citocinas e radiação ultravioleta. No núcleo o NF- $\kappa$ B promove a transcrição de diversos moduladores como citocinas pró-inflamatórias e RAGE..... 61
- Figura 4-** Expressão de NF- $\kappa$ B em córnea (CO), conjuntiva (CJ) e glândula lacrimal (GL) de animais jovens. Os tecidos foram extraídos e avaliados por “western blotting” ..... 86

<b>Figura 5-</b>	Expressão e ativação do NF- $\kappa$ B em frações nuclear e citoplasmática de GL de animais diabéticos, controles. Após extração, separação das frações nuclear e citoplasmática e normalização pela concentração protéica, amostras de GLs foram comparadas por “western blotting”, (n=6 animais/grupo) ( $P=0,02$ ).....	87
<b>Figura 6-</b>	Expressão e ativação do NF- $\kappa$ B em frações nuclear e citoplasmática de GL de animais senis e adultos jovens. Após extração, separação das frações nuclear e citoplasmática e normalização pela concentração protéica, amostras de GLs foram comparadas por “western blotting”, (n=6 animais/grupo) ( $P=0,02$ ).....	88
<b>Figura 7-</b>	Microscopia confocal com imunofluorescência, demonstrando a localização e expressão nuclear e citoplasmática de NF- $\kappa$ B (verde) nas células acinares de GL de animais controle (A) e diabéticos (B) , de AGEs (verde) na membrana basal e tecido conectivo de GL nos animais controle (C) e nos diabéticos (D) e das proteínas RAGE (verde) nos ductos glandulares de animais controle (E) e diabéticos (F). Contracoloração com faloidina (vermelho) indicando a localização da actina nas membranas epiteliais.....	90
<b>Figura 8-</b>	Microscopia confocal com imunofluorescência, demonstrando a localização e expressão nuclear e citoplasmática de NF- $\kappa$ B (verde) nas células acinares de GL de animais adultos jovens (A) e senis (B), de AGEs (verde) na membrana basal e tecido conectivo de GL nos animais adultos jovens (C) e nos senis (D) e das proteínas RAGE (verde) nos ductos glandulares de animais adultos jovens (E) e senis (F). Contracoloração com faloidina (vermelho) indicando a localização da actina nas membranas epiteliais.....	91

**Figura 9-** Microscopia confocal com imunofluorescência, demonstrando a expressão de RAGE (verde) nas células epiteliais da córnea de animais controle (A) e diabéticos (B). Contracoloração com faloidina (vermelho) indicando a localização da actina nas membranas epiteliais..... 92

**Figura 10-** Microscopia confocal com imunofluorescência, demonstrando a expressão de RAGE (verde) nas células epiteliais da córnea de animais adultos jovens (A) e senis (B). Contracoloração com faloidina (vermelho) indicando a localização da actina nas membranas epiteliais..... 92





## ***RESUMO***

Este estudo avaliou as possíveis vias comuns na fisiopatogênese da síndrome do olho seco no *Diabetes Mellitus* (DM) e no envelhecimento, envolvendo o acúmulo dos produtos de glicosilação (“Advanced Glycation End-products” - AGEs), seu receptor RAGE e a ativação do Fator Nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) na glândula lacrimal (GL) e alterações do filme lacrimal nessas condições.

Modelos animais de DM induzido com estreptozotocina e animais senis (24 meses de vida) foram comparados a animais controle tratados com tampão citrato e adultos jovens (2 meses de vida). Foram avaliadas vias de sinalização, envolvendo AGEs, RAGE e a ativação do NF- $\kappa$ B na GL e alterações no filme lacrimal em ratos Wistar de todos os grupos.

A análise do filme lacrimal foi realizada através de medidas de volume de secreção basal e dosagem de citocinas como a Interleucina-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) e Fator de Necrose Tumoral -  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ). A capacidade secretória da GL foi avaliada através de medidas da atividade de peroxidase. Técnicas de “western blot” foram utilizadas para avaliar a expressão e ativação do NF- $\kappa$ B na GL. A expressão de AGE, RAGE e NF- $\kappa$ B na GL e córnea nos grupos estudados, foi avaliada através de microscopia confocal com imunofluorescência.

O volume lacrimal foi significativamente menor nos animais diabéticos e senis ( $P=0,02$  e  $0,016$ , respectivamente). Concentrações de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  na lágrima foram mais altas nos ratos diabéticos e senis do que nos controles e adultos jovens ( $P=0,007$  e  $0,02$  nos diabéticos e  $P= 0,007$  e  $P= 0,05$  nos senis). A atividade de peroxidase foi significativamente mais baixa no grupo senil ( $P=0,016$ ), mas não nos experimentos, comparando animais diabéticos e controles ( $P=0,34$ ). A expressão de AGE, RAGE e NF- $\kappa$ B na GL foi aumentada nos animais diabéticos e senis.

O DM e a senilidade induzem alterações estruturais e secretórias significativas na GL e nos tecidos da superfície ocular e associa-se a maior incidência de olho seco. A expressão aumentada de AGE, RAGE e NF- $\kappa$ B na GL sugere a participação desses fatores nas vias de sinalização e subseqüentes alterações inflamatórias relacionadas ao olho seco nessas condições.



***ABSTRACT***

The present study evaluates the dry eye syndrome related to diabetes and aging through the involvement of the Advanced Glycation End-product (AGEs), the Advanced Glycation End-product Receptor (RAGE) axis and Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation in lacrimal gland (LG) and tear film dysfunction in these conditions.

To evaluate whether AGE, RAGE and NF- $\kappa$ B signaling in LG are altered in diabetes and aging, streptozotocin-induced diabetic, normoglycaemic, aging (24 month-old) and young adults (2 month-old) male Wistar rats were compared. Tear film alterations and the expression of AGE, RAGE and NF- $\kappa$ B in ocular tissues were evaluated in all considered groups.

Tear secretion parameters as basal tear secretion volume, Interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) and Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) levels and LG and peroxidase activity in LG tissue were measured. NF- $\kappa$ B expression and activation was evaluated in LG by western blot. Immunohistochemistry with confocal microscopy was used to assess AGE, RAGE and NF- $\kappa$ B expression in LG of all groups.

Tear volume was significantly lower in diabetic and aging rats ( $P=0.02$  and  $0.016$ , respectively). IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  concentrations in tears were higher in diabetic and aging than in control and young rats ( $P=0.007$  and  $0.02$  in diabetic and  $P= 0.007$  and  $P= 0.05$  in aging). Peroxidase activity was significantly lower in the aging group ( $P=0.016$ ) but not the assays with diabetic rats ( $P=0.34$ ). AGE, RAGE and NF- $\kappa$ B expressions were increased in LG of diabetic and aging rats.

Diabetes and aging induce significant alterations in rat LG structure and secretion. The higher expression of AGE, RAGE and NF- $\kappa$ B in LG may suggest that these factors are involved in signalling and in subsequent inflammatory alterations related to dry eye related to these conditions.



## ***1. INTRODUÇÃO***

O *Diabetes Mellitus* (DM) e a senilidade representam desafios crescentes para a saúde pública e qualidade de vida. As complicações associadas a essas condições, inclusive para a superfície ocular, não têm ainda seu mecanismo bem esclarecido e, portanto terapêutica consolidada. A avaliação dos produtos finais de glicosilação (AGEs) e do Fator Nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) nas complicações relacionadas ao DM e à senilidade em tecidos vasculares e neurais, tem indicado uma via fisiopatológica que poderia ajudar a compreender as disfunções lacrimais e da superfície ocular (Singh et al., 2001; Stitt, 2001; Vlassara et al., 1994).

### **1.1. Superfície ocular e filme lacrimal**

A superfície ocular compreende, anatomicamente, a mucosa margeada pelas bordas palpebrais, estendendo-se da conjuntiva tarsal à superfície anterior do globo 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 umas às outras, apresentam distribuição uniforme e características próprias e do tecido de sustentação subjacente que variam conforme cada região (Faria e Souza et al., 2006; Kinoshita et al., 2001; Tseng e Tsubota, 1997).

O filme lacrimal é composto por lípidos, elaborados pelas glândulas de Meibomius, uma porção aquosa produzida pelas glândulas lacrimais e mucina das células caliciformes conjuntivais. Este filme recobre toda 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, garantindo 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 (Lemp, 1995; Nelson, 1982; Pflugfelder, 1998; Tseng e Tsubota, 1997; Watanabe, 2002). No filme lacrimal estão presentes ainda glicose,

lactato, uréia, alguns hormônios como insulina, prolactina e hormônio tireoidiano, fatores de crescimento como EGF, TGF- $\beta$  e IGF-1, além de vitamina A e diversos eletrólitos como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+</sup>, Mg<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Gupta et al., 1996; Ohashi et al., 1989; Rocha et al., 2002; Sullivan e Hann, 1989; Sullivan et al., 1998; Ubels et al., 1986).

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 (Huang et al., 2002; Rieger, 1992). Em condições normais de concentração e distribuição de todos os componentes da lágrima, a formação do filme lacrimal estável recobrando toda superfície ocular é garantida pelo fator hidrodinâmico do fechamento completo e periódico das pálpebras durante o piscar. Este mecanismo garante a distribuição homogênea da lágrima pela superfície ocular e posterior drenagem para o sistema nasolacrimal, propiciando a estabilidade do filme lacrimal e renovação de seus constituintes. Esta integração neuroanatômica é controlada por dois arcos reflexos mediados pelo nervo trigêmeo e explica como diferentes constituintes anatômicos da superfície ocular, como as glândulas anexas e as pálpebras estão integrados com a superfície epitelial na manutenção do filme lacrimal estável e de uma superfície ocular saudável. As vias aferentes de ambos arcos reflexos estão localizadas nas terminações sensitivas do nervo trigêmeo na superfície ocular e comandam respostas eferentes motoras para as pálpebras e secretórias para a glândula lacrimal por meio de raízes motoras e parassimpáticas do nervo facial, respectivamente (Doane, 1980; Tsubota e Nakamori, 1995). A redução lacrimal neurogênica ocorre nas situações em que este arco reflexo encontra-se abolido ou diminuído, como DM e senilidade (Hyndiuk et al., 1977; Ishida et al., 1984; Mathers et al., 1996), seja no componente aferente com a diminuição da sensibilidade corneana, ou no componente eferente levando a diminuição da secreção lacrimal e motricidade palpebral. Nestes casos pode ocorrer a ceratopatia neurotrófica, caracterizada pelo ressecamento da superfície ocular e defeitos epiteliais de difícil cicatrização e importante comprometimento da acuidade visual (Heigle e Pflugfelder, 1996).

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 eficaz (Kinoshita et al., 2001; Nelson, 1982; Pflugfelder et al., 2000; Tseng e Tsubota, 1997).

## **1.2. Olho seco**

Olho seco pode ser definido como alteração do filme lacrimal, causada por deficiência na produção de lágrimas ou evaporação excessiva que causa dano à superfície ocular interpalpebral e se associa a sintomas de desconforto ocular. 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).

A prevalência de olho seco varia de 5 a 33% e essa variabilidade depende do desenho do estudo e da população analisada (Bandein-Roche et al., 1997; Lee et al., 2002; Lemp, 1998; Lin et al., 2005; McCarty et al., 1998; Schaumberg et al., 2002; Schein et al., 1997; Shimmura et al., 1999). Alguns fatores de risco associam-se a maior ocorrência de sintomas de desconforto ocular relacionados ao olho seco como história de artrite reumatóide, tireiodopatias, DM, menopausa, algumas medicações como antidepressivos, diuréticos, anti-histamínicos, uso de lentes de contato, além de fatores ambientais e hábitos de vida (Lemp, 1995; McCarty et al., 1998; Moss et al., 2000; Schaumberg et al., 2001; Schaumberg et al., 2002; Schein et al., 1997).

As glândulas lacrimais (GL) são responsáveis pela secreção da fração aquosa do filme lacrimal carregando além de água, diversos nutrientes e eletrólitos que umidifica e mantêm o metabolismo da superfície ocular, garantindo qualidade óptica, conforto e proteção (Lemp, 1995; Rocha et al., 2006; Rocha et al., 2000b; Zoukhri, 2006). 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 (Wilson, 1991).

Diversas doenças degenerativas podem acometer as GL determinando perda funcional, manifestações de olho seco e alterações de superfície ocular. Alterações auto-imunes como a Síndrome de Sjögren (Sullivan et al., 1999; Toda et al., 1999), alterações de caráter indeterminado presentes em doenças crônicas como o DM (Goebbels, 2000; Nepp et al., 2000; Ramos-Remus et al., 1994; Seifart e Stempel, 1994), influências hormonais (Sullivan, 1997; Sullivan et al., 1999) e ainda processos fisiológicos relacionados ao envelhecimento (Bromberg e Welch, 1985; Schein et al., 1997; Zoukhri, 2006) figuram como principais mecanismos acometimento das glândulas lacrimais.

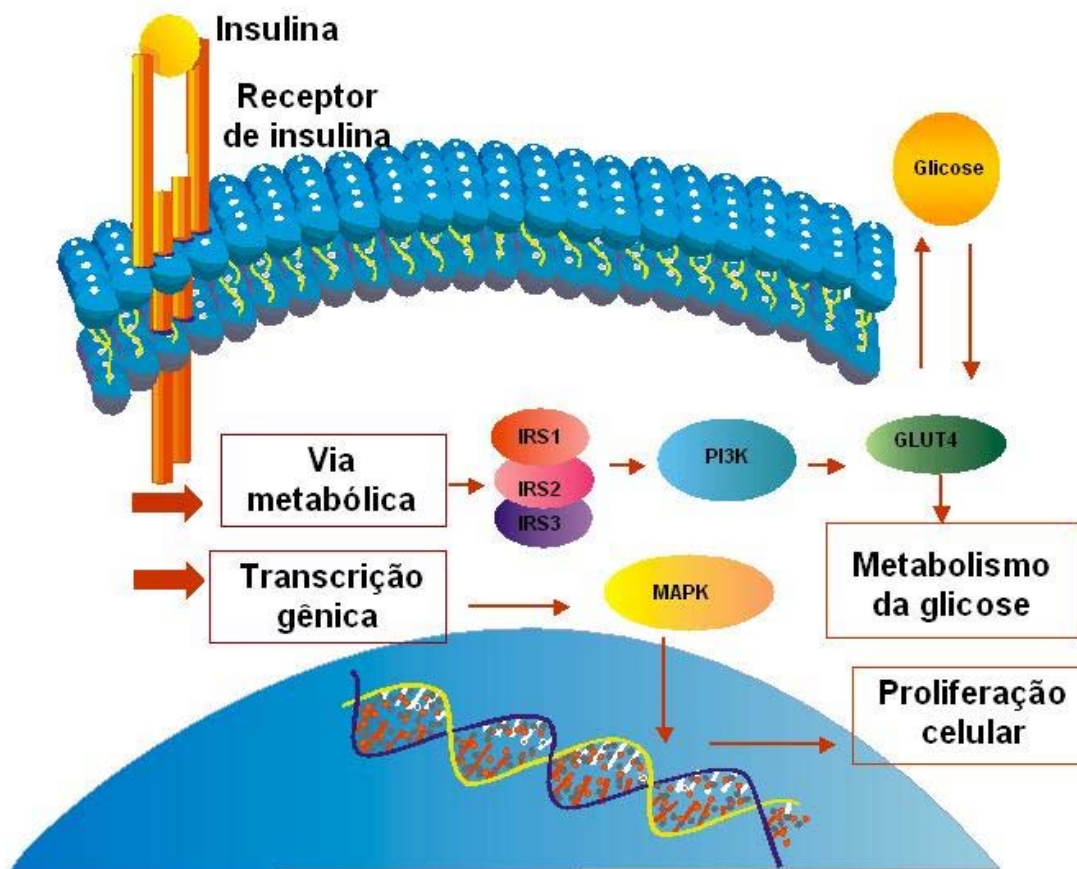
Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas alterações relacionadas ao olho seco ainda não estão inteiramente elucidados. Apoptose, disfunções hormonais, produção de auto-anticorpos, alterações na sinalização celular, disfunção neural e aumento de citocinas pró-inflamatórias são considerados possíveis mediadores na insuficiência da glândula lacrimal (Zoukhri, 2006). Há uma maior expressão de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  no epitélio conjuntival de pacientes com Síndrome de Sjögren (Solomon et al., 2001; Zoukhri, 2006; Zoukhri et al., 2002). A deficiência lacrimal causa abrasão mecânica e cria 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 à redução de promotores de crescimento como EGF e retinol afetam a diferenciação epitelial na superfície ocular e, conseqüentemente, induzem hiperplasia, aumento da atividade mitótica, expressão diminuída de moléculas de proteção como a mucina e diminuição de células caliciformes (Pflugfelder, 1998; Pflugfelder et al., 1999; Rocha et al., 1998; Zoukhri, 2006).

O DM e a senilidade associam-se a anormalidades do filme lacrimal, distúrbios de superfície ocular e maior incidência de sinais e sintomas de olho seco. Pacientes diabéticos apresentam sinais de metaplasia conjuntival, filme lacrimal instável e secreção basal diminuída o que se associa à maior prevalência de sintomas de olho seco e maior consumo de lubrificantes (Goebbels, 2000; Kaiserman et al., 2005; Nepp et al., 2000; Seifart e Stempel, 1994).

### **1.3. Insulina e superfície ocular**

A insulina é um hormônio de 7000-Da produzido e secretado pela células  $\beta$  pancreáticas, que exerce inúmeros efeitos metabólicos e mitogênicos. A grande variedade de ações da insulina é exercida através da homeostase da glicose, do controle de substratos energéticos e da promoção de crescimento e diferenciação celular em diversos tecidos-alvo (Myers e White, 1996; White e Kahn, 1994).

A ação da insulina é desencadeada pela sua ligação com o receptor específico na membrana plasmática. O receptor da insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituído por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$  é extracelular e contém o sítio de ligação da insulina e a subunidade  $\beta$  tem localização transmembrânica e é uma proteína com atividade tirosina quinase responsável pela transmissão do sinal através de processos de autofosforilação e fosforilação de outros substratos (Kasuga et al., 1982). Subseqüentemente à ligação da insulina ao seu receptor, ocorrem alterações conformacionais na subunidade  $\beta$ , estimulando a atividade quinase através da fosforilação de substratos protéicos intracelulares responsáveis por deflagrar uma cadeia de eventos que direcionam o sinal da insulina para diferentes compartimentos celulares. O complexo sistema de transmissão do sinal da insulina apresenta ainda mecanismos de amplificação, inibição e interação com vias de sinalização de outros transmissores, como citocinas, hormônios e fatores de crescimento (Myers e White, 1996; Saad, 1994; White e Kahn, 1994). Condições que determinem a redução da produção do hormônio pelas células pancreáticas ou por situações que resultem em resistência periférica à sua ação, afetam a sinalização da insulina em tecidos alvo (Saad, 1994; Saad et al., 1997).



**Figura 1.** Vias de sinalização da insulina. Representação esquemática da ligação da insulina ao seu receptor (RI) induzindo a ativação deste e a subsequente ativação de vias de sinalização citoplasmáticas, dirigidas à atividade metabólica – via IRS, PI3K e GLUT 4, e nuclear para transcrição gênica e controle de proliferação celular – via MAPK.

A constatação da presença de insulina no filme lacrimal e na GL e da identificação de receptor de insulina e do receptor de IGF-1 na córnea, conjuntiva e GL reforçam o importante papel deste hormônio na manutenção da superfície ocular (Cunha et al., 2005; Rocha et al., 2002; Rocha et al., 2000a).

Estudos, demonstrando que a GL armazena e secreta insulina sob a influência de fatores locais como níveis de glicose e estímulo nervoso e mediada pela presença do transportador de glicose – GLUT, consolidam o papel deste hormônio na promoção de eventos metabólicos e proliferação celular na superfície ocular (Cunha et al., 2005).

Em modelos animais de DM induzido por estreptozotocina, as vias de sinalização celular da insulina na GL estão diminuídas desde a ativação do receptor de insulina, levando a um menor crescimento dessas glândulas, menor produção lacrimal e níveis diminuídos de imunoglobulinas (Rocha et al., 2000a).

O envelhecimento afeta estrutural e funcionalmente a GL e associa-se a maior incidência de olho seco e alterações de superfície ocular. Modelos animais de envelhecimento apresentam significativa hiperinsulinemia e resistência periférica a ação desse hormônio e diminuição nas vias de sinalização da insulina na GL (Rocha et al., 2003).

Diversos estudos têm identificado hormônios e fatores de crescimento e seus receptores nos tecidos da superfície ocular e na GL (Rocha et al., 2000a). Alguns fatores de crescimento como EGF, NGF e IGF-1 apresentam mecanismos de sinalização celular semelhantes aos da insulina (Habib et al., 1998; Sasaoka et al., 1996).

Considerando que a insulina é tida como um poderoso elemento anabólico fundamental para a proliferação epitelial corneana e manutenção de cultura de células de córnea e glândula lacrimal, as alterações de superfície ocular relacionadas ao DM e ao envelhecimento, como olho seco, defeitos epiteliais e edema corneano podem estar intimamente correlacionados à ausência ou diminuição da ação deste hormônio nestes tecidos (Pellegrini et al., 1997; Rocha et al., 2002).

#### **1.4. *Diabetes Mellitus***

*Diabetes Mellitus* (DM) é considerado uma das principais causas de morbidade e mortalidade em humanos. Nas últimas décadas, houve um aumento significativo na incidência de DM em todo mundo. Mudanças ambientais, hábitos alimentares e sedentarismo associados a fatores genéticos têm contribuído para índices crescentes de obesidade e DM e suas inúmeras complicações associadas (King et al., 1998; Kopelman, 2000; Zimmet et al., 2001).

O DM tipo 1 está associado à destruição auto-imune das ilhotas  $\beta$  pancreáticas, resultando na absoluta deficiência da produção de insulina. O DM tipo 2 engloba cerca de 90% dos casos da doença e é caracterizado pela secreção anormal da insulina ou por resistência dos tecidos periféricos à ação deste hormônio. O DM tipo 2 é numericamente mais prevalente na população geral, enquanto que o tipo 1 é considerado uma das doenças crônicas mais prevalente em crianças. Entretanto, índices crescentes na incidência de DM tipo 2 em crianças e adolescentes têm sido reportados em associação com obesidade infantil (Nathan, 1993; Taylor, 1999; Zimmet et al., 2001).

A incidência de DM em todo mundo tem assumido proporções epidêmicas. Paradoxalmente, parte da gênese deste problema está no aumento da expectativa de vida e melhoria das condições de saúde. Projeções revelam um aumento de 46% na incidência de DM em todo mundo, estima-se que o número de diabéticos chegue a 220 milhões em 2010, confrontando com cerca de 150 milhões de diabéticos e 2000 (Amos et al., 1997; King et al., 1998).

Ambas as formas de DM estão associadas à hiperglicemia crônica e ao desenvolvimento de complicações relacionadas a alterações microvasculares em diversos órgãos e tecidos, como retina, glomérulos renais e nervos periféricos. DM é considerado a principal causa de cegueira irreversível, falência renal e neuropatia debilitante e está ainda relacionado à maior progressão de aterosclerose e risco de doenças cardiovasculares associadas (The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993).

A patogênese das complicações relacionadas à hiperglicemia ainda não está completamente definida. A formação e acúmulo de AGEs em suas diversas vias moleculares e as alterações estruturais e funcionais desencadeadas pelos processos de “stress” oxidativo e ativação de mediadores inflamatórios têm sido relatadas e avaliadas em diversos estudos e ensaios clínicos (Baynes, 1991; Brownlee, 2001; Brownlee et al., 1988).

Como doença sistêmica, as repercussões oftalmológicas do DM são variadas e incluem, retinopatia diabética, erros refracionais, catarata, glaucoma neovascular e paresias oculomotoras. Defeitos epiteliais persistentes, diminuição da sensibilidade corneana, úlceras neurotróficas associadas a olho seco são alterações de superfície ocular frequentes cuja patogênese ainda não está bem compreendida (Azar et al., 1992; Goebbels, 2000; Ishida et al., 1984; Nepp et al., 2000).

### **1.5. Envelhecimento**

O aumento da expectativa de vida traz preocupações relacionadas à incidência de doenças degenerativas e seus desdobramentos para o indivíduo e para a sociedade

(Blay et al., 1991; Veras, 1991).

A senilidade traduz-se pelo declínio de funções fisiológicas e associa-se à diminuição da qualidade de vida e maior suscetibilidade a doenças. (Crews e Zavotka, 2006; Martin e Grotewiel, 2006). Assim, torna-se relevante a compreensão dos mecanismos fisiopatogênicos subjacentes aos distúrbios característicos do envelhecimento.

Alterações da superfície ocular relacionadas ao olho seco tem sua incidência aumentada com a idade. O olho seco associado à senilidade se traduz clínica e experimentalmente através de alterações funcionais e histológicas da GL, além de distúrbios bioquímicos como na sinalização da insulina (Bromberg e Welch, 1985; Draper et al., 2003; Mathers et al., 1996; Rocha et al., 2003).

Vias metabólicas comuns entre DM e senilidade correlacionam mecanismos que envolvem disfunções hormonais relacionadas à insulina (Messier, 2005; Messier e Teutenberg, 2005; Rocha et al., 2003), acúmulo de AGEs (Stitt, 2001; Vlassara et al., 1994) e ativação do NF- $\kappa$ B (Tak e Firestein, 2001). Estas correlações podem auxiliar tanto o entendimento da fisiopatologia de doenças cardiovasculares e degenerativas, como doença de Alzheimer e catarata, comuns ao processo de envelhecimento, como as diversas complicações relacionadas ao DM.

## 1.6. AGEs

### 1.6.1. Formação dos AGEs:

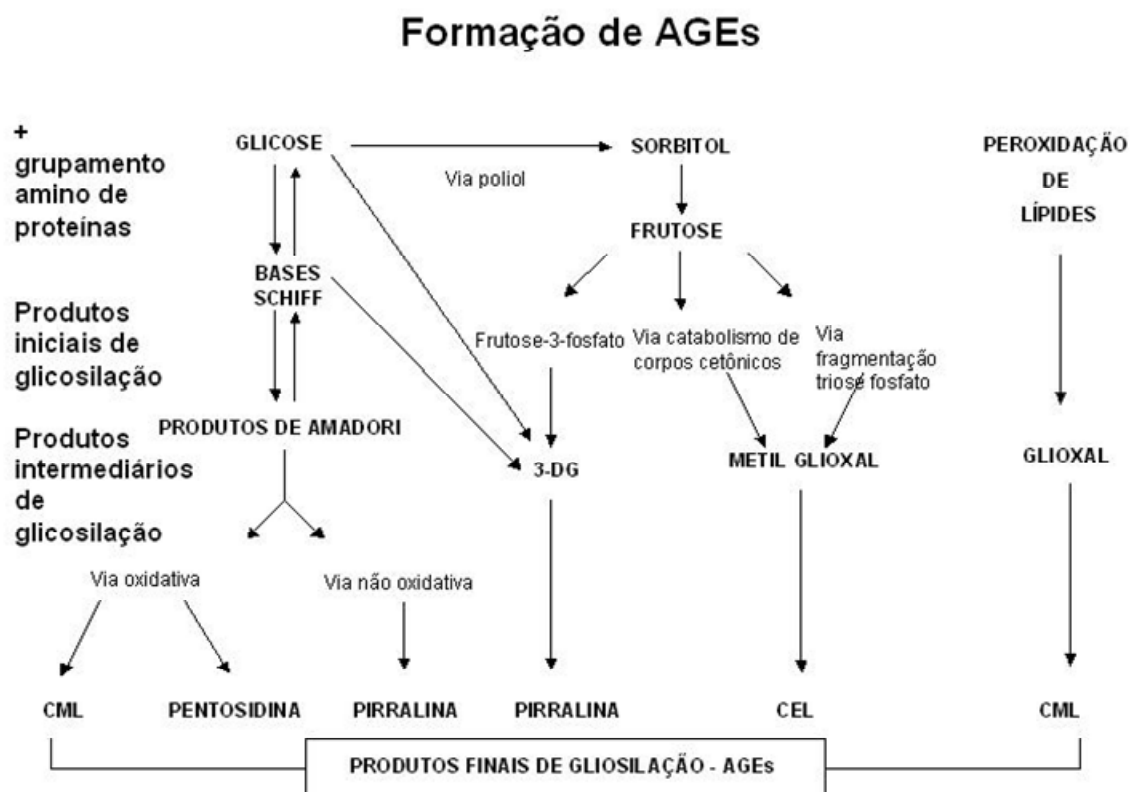
Em 1912, o químico francês, Louis Camille Maillard descreveu pela primeira vez uma série de reações não enzimáticas que modificavam a coloração, o aroma e as propriedades nutricionais dos alimentos. Este processo denominado glicosilação é também conhecido como reação de Maillard (Maillard, 1912). Recentemente, a formação e acúmulo destes compostos têm sido vistos como importante evento fisiopatológico em diversas doenças (Baynes, 1991; Baynes e Thorpe, 1999; Fu et al., 1994; Stitt, 2001; Vlassara et al., 1994).

Os açúcares reagem através de vias não enzimáticas de glicosilação com grupamento amino terminal de proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, formando compostos denominados bases Schiff e produtos de Amadori em fases iniciais, e tardiamente, os produtos finais de glicosilação avançada, denominados coletivamente por AGEs – “Advanced Glycation Endproducts” (McFarland et al., 1979).

As bases Schiff são produtos iniciais das reações de glicosilação e sua formação ocorre de maneira proporcional à concentração de glicose. Estas bases sofrem rearranjos, formando complexos mais estáveis denominados produtos de Amadori que não ultrapassam em mais de duas a três vezes seus níveis normais e são considerados produtos intermediários de glicosilação. O equilíbrio nos níveis de bases Schiff e produtos de Amadori é atingido em horas e semanas, respectivamente, e a natureza reversível destes compostos permite a normalização de seus níveis uma vez que a concentração de glicose diminui (Brownlee et al., 1988; Vlassara et al., 1981).

Os AGEs são um grupo heterogêneo de compostos formados através de reações progressivas de desidratação, condensação, fragmentação, oxidação e ciclização de produtos intermediários da exposição de proteínas à glicose em diversos níveis. Estes compostos são irreversíveis e devido à sua grande heterogeneidade e instabilidade durante os processos de isolamento, sua estrutura permanece pouco elucidada (Pongor et al., 1984; Singh et al., 2001; Vlassara et al., 1994).

A formação de AGEs envolve reações entre a terminação carbonil de açúcares com grupamento amino de proteínas, lípides e ácidos nucleicos através da via polioliol e das reações com a glicose, como demonstrado no esquema abaixo:



**Figura 2-** Formação de AGEs. Reações entre a terminação carbonil de açúcares com grupamento amino de proteínas e lípides, através das reações com a glicose, da via polioliol e peroxidação de lípides. Formação de produtos iniciais e intermediários denominados bases Schiff e produtos de Amadori, respectivamente, de natureza reversível e, posteriormente, produtos finais estáveis e irreversíveis, os AGEs.



A estrutura de alguns AGEs como a CML, pentosidina e pirralina já foi bem caracterizada e, apesar de imunologicamente distintos coexistem em diversas associações com albumina, hemoglobina, proteínas lenticulares e colesterol (Fu et al., 1994; Singh et al., 2001).

A hemoglobina glicosilada, formada através de reações entre a hemoglobina e produtos de Amadori, tem sido utilizada como marcador de controle glicêmico em pacientes diabéticos e é considerada um precursor da hemoglobina-AGE (Singh et al., 2001; Vlassara et al., 1994). A hemoglobina-AGE corresponde a 0,42% da hemoglobina circulante em indivíduos normais e 0,75% em diabéticos, servindo como marcador da formação de AGEs in vivo e da concentração sérica de glicose por períodos mais longos do que a hemoglobina glicosilada (Makita et al., 1992).

#### 1.6.2. AGEs e proteínas:

Os processos de glicosilação afetam principalmente proteínas de vida longa. Componentes estruturais da matriz extracelular, como o colágeno e membrana basal são alvos primários, entretanto estas reações podem ser evidenciadas ainda em outros complexos protéicos como mielina, complemento, tubulina, ativador do plasminogênio e fibrinogênio (McCance et al., 1993).

O acúmulo de AGEs em componentes da matriz extracelular é proporcional ao tempo de exposição dessas proteínas a altos níveis de glicose e pode ser demonstrado através de medidas do seu espectro específico de fluorescência e da diminuição da solubilidade do colágeno associadas ao DM e aos processos envelhecimento (Pongor et al., 1984; Schnider e Kohn, 1980; 1981).

Os complexos formados com AGEs e proteínas são capazes de interagirem e de induzirem a deposição de uma grande variedade de proteínas como lipoproteínas, imunoglobulinas, fibrina e albumina levando a diversos eventos patológicos. A deposição de lipoproteínas, por exemplo, está relacionada à formação de placas de ateroma e a deposição de imunocomplexos nos glomérulos resulta em dano da função renal (Kume et

al., 1995; Miyata e Monnier, 1992). AGEs interferem quimicamente na ação do óxido nítrico presente no endotélio vascular, sendo mediadores dos defeitos de vasodilatação e hipertensão no DM e envelhecimento (Vlassara et al., 1992).

Outra relevante propriedade dos AGEs é a capacidade de manter processos contínuos de polimerização de proteínas glicosiladas mesmo na ausência de glicose livre. Em estudos realizados com a incubação de glicose e ribonuclease, observou-se que a incorporação da glicose atinge equilíbrio em dois dias e, após a remoção de glicose livre do meio, a ribonuclease glicosilada continua processo de polimerização e formação de AGEs. Tal fato implica na progressão das complicações tissulares do DM, verificadas mesmo após o controle restrito da glicemia (Eble et al., 1983).

#### 1.6.3. AGEs e lípidos:

Quando incubados com glicose, lípidos contendo grupamento amino formam compostos com propriedades semelhante aos AGEs em tempo e concentração dependentes. A formação e acúmulo de AGEs na parede vascular associado a mecanismos pró-inflamatórios desencadeados pela ativação do RAGE promovem manutenção do “stress” oxidativo e dano vascular. Estes achados sugerem a participação das reações de glicosilação nos processos de aterogênese (Bucala et al., 1993; Naka et al., 2004; Yan et al., 2003).

#### 1.6.4. AGEs e ácidos nucleicos:

Em contraste com as macromoléculas citoplasmáticas, as quais parecem não sofrer ação da exposição a altos níveis de glicose em razão de seu alto “turn over”, o DNA pode acumular AGEs. Plasmídeos infectados em bactérias capazes de acumular glicose 6-fosfato apresentam altos índices de mutação, quando a concentração intracelular de glicose é elevada, formando AGE-DNA. Esta atividade pode estar relacionada ao desenvolvimento mais freqüente de anormalidades fetais em grávidas diabéticas e na incidência aumentada de cânceres relacionados à idade (Bucala et al., 1994).

### 1.6.5. RAGE:

A ligação dos AGEs com receptores modula tanto as vias de ativação celular e disfunção tissular quanto os mecanismos para degradação e remoção de AGEs, e a expressão desses receptores encontra-se aumentada no DM (Singh et al., 2001). Diversas proteínas tem sido identificadas como receptores de AGEs e são expressas em diversas células como, monócitos, macrófagos, células endoteliais, podócitos, astrócitos e microglia. Dentre elas destacam-se o complexo OST-48 ou AGE-R1, a fosfoproteína 80k-H ou

AGE-R2, a galectina 3 ou AGE-R3 e o RAGE (Pugliese et al., 2000; Singh et al., 2001; Vlassara et al., 1988).

O RAGE é dentre os vários receptores de AGEs já identificados, o melhor caracterizado. Trata-se de um multiligante da superfamília das imunoglobulinas de peso molecular de 35-kD, que age como mediador de sinalização intracelular e metabolismo celular. O RAGE é expresso em diversas células, como as endoteliais, monócitos/macrófagos e neurônios e interage com diversos ligantes incluindo AGEs e moduladores de resposta inflamatória como as S100 calgranulinas e anfoterinas (Li et al., 1996; Naka et al., 2004; Vlassara et al., 1988; Yan et al., 2003). A ligação do RAGE converte sinais rápidos de ativação celular em mecanismos duradouros de disfunção celular e destruição tissular (Bierhaus et al., 2005).

A ligação AGE-RAGE desencadeia a ativação do NF- $\kappa$ B, levando à ativação de vias de sinalização envolvidas nas disfunções vasculares, na gênese da aterosclerose e inúmeras alterações celulares relacionadas às complicações moduladas pelo acúmulo de AGEs (Ehlermann et al., 2006; Li et al., 1996; Naka et al., 2004; Vlassara et al., 1988; Yan et al., 2003).

Estudos com animais geneticamente modificados para expressão de RAGE e bloqueio de ligantes específicos têm demonstrado o envolvimento do RAGE em processos fisiopatológicos do DM, doenças inflamatórias crônicas, aterosclerose e desordens neurodegenerativas. Além disso sugerem um possível efeito protetor do bloqueio da ação do RAGE no desenvolvimento dessas disfunções (Bierhaus et al., 2005; Cataldegirmen et al., 2005; Hudson e Schmidt, 2004; Rong et al., 2005)

#### 1.6.6. Metabolismo dos AGEs:

A remoção dos tecidos e células modificados pelo acúmulo de AGEs é facilitada pela ligação dos AGEs a receptores específicos identificados, primeiramente, na membrana monócitos e macrófagos e subsequentemente em células endoteliais, células mesangiais, fibroblastos e células neurais (Li et al., 1996; Vlassara et al., 1988). A ligação entre ligantes dos AGEs e seus receptores induz quimiotaxia, ativação celular e secreção de citocinas e fatores de crescimento. Após a degradação, pequenos peptídeos solúveis são eliminados principalmente por via renal. Receptores presentes nas células de Kupffer, nas células sinusoidais do fígado e no endotélio renal apresentam mediadores de endocitose de AGEs plasmáticos (Singh et al., 2001; Vlassara et al., 1985).

#### 1.6.7. Conseqüências do acúmulo de AGEs:

Evidências sugerem que as interações celulares relacionadas à progressão da vasculopatia diabética e da aterosclerose têm início com o acúmulo e a deposição dos AGEs na parede dos vasos, seguida de aumento da permeabilidade vascular, recrutamento e ativação de mediadores inflamatórios que associadas aos distúrbios nas propriedades dos receptores de AGEs geram as diversas disfunções tissulares e complicações vistas no DM e envelhecimento (Pugliese et al., 2000; Vlassara et al., 1992).

Nos nervos periféricos, eventos análogos são induzidos pela deposição de AGEs na mielina e em estruturas axonais, desencadeando aumento da permeabilidade na vasa nervorum, oclusões progressivas e dano isquêmico. Além disso, a glicosilação em componentes neuronais inicia respostas de ativação celular mediadas pela ligação AGEs com seus receptores, semelhantes às vistas em outros tecidos (Vlassara et al., 1981).

As vias de sinalização de diversos fatores de crescimento são mediadas pela ligação a um receptor transmembrana com atividade tirosina quinase, como por exemplo o EGFR. Estudos com cultura de células e modelos animais de DM demonstraram que o acúmulo de AGEs inibem a fosforilação do EGFR, alterando consequentemente, o funcionamento de vias de crescimento celular (Okamoto et al., 1988; Portero-Otin et al., 2002).

#### 1.6.8. AGES e olho:

A opacificação do cristalino é um fenômeno relacionado mais comumente ao envelhecimento e tem incidência mais precoce e progressão mais rápida em pacientes diabéticos. A deposição de AGEs nas proteínas constituintes do cristalino tem sido reportado como um dos principais fatores relacionados à formação da catarata (Ahmed et al., 2003; Das et al., 1998; Lyons et al., 1991; Saxena et al., 2000).

A retinopatia diabética é caracterizada por alterações vasculares desencadeadas por dano morfológico e funcional específico como a perda de pericitos e aumento da permeabilidade vascular. O acúmulo de AGEs contribui para esta vasculopatia através do aumento da permeabilidade das células endoteliais, desenvolvimento de fenômenos oclusivos e ativação de fatores de crescimento como VEGF responsáveis pela angiogênese e neovascularização vítreo-retiniana (Kalfa et al., 1995; Lu et al., 1998; Moore et al., 2003; Stitt et al., 1997b). Além disso, depósitos de AGE associados à localização de RAGE nas células do epitélio pigmentar da retina sugerem ainda a participação desses fatores no desenvolvimento da degeneração macular relacionada à idade (Handa et al., 1999; Howes et al., 2004).

A superfície ocular também parece ser afetada pelo acúmulo de AGEs relacionado ao DM e aos processos de envelhecimento. A glicosilação na membrana basal das células epiteliais da córnea altera a adesão e a migração destas células, levando a defeitos epiteliais recorrentes e a retardo de cicatrização (Kaji et al., 2000; Sady et al., 1995). As células endoteliais da córnea apresentam diminuição de sua densidade e função com a idade. A presença de receptores específicos de AGEs nestas células permite a incorporação e acúmulo de AGEs, induzindo apoptose através da indução “stress” oxidativo e ativação de mediadores de inflamação e dano celular (Kaji et al., 2003).

#### 16.9. Inibidores de AGEs:

A natureza complexa e heterogênea dos AGEs torna muito difícil o desenvolvimento de inibidores específicos. Além disso, as complexas reações envolvidas nos processos de glicosilação ocorrem em diversos estágios e ainda não estão totalmente elucidadas.

A aminoguanidina, um composto semelhante à hidralazina, é tido como um inibidor de AGEs que pode se tornar uma nova classe de drogas no tratamento do DM e complicações associadas. Estudos com este composto demonstram sua ação através da ligação com produtos intermediários de glicosilação, bloqueando a formação de produtos de Amadori e dos rearranjos subseqüentes, necessários á formação de compostos intermediários e avançados (Ulrich e Zhang, 1997). Em estudos com modelos animais de DM, a aminoguanidina têm demonstrado um efeito inibidor na formação e acúmulo de AGEs. Estes estudos também demonstraram diminuição no desenvolvimento das complicações relacionadas como, retinopatia, nefropatia e neuropatia, evidenciado pela redução na neovascularização retiniana, da albuminúria, melhora na função dos nervos periféricos e do perfil lipídico (Edelstein e Brownlee, 1992; Kern et al., 2000). Entretanto, efeitos colaterais como anemia, desenvolvimento de auto-anticorpos ANCA e ANA e neoplasias renais e pancreáticas foram evidenciados em estudos com humanos e modelos animais, respectivamente (Boel et al., 1995; Singh et al., 2001).

## **1.7. NF- $\kappa$ B**

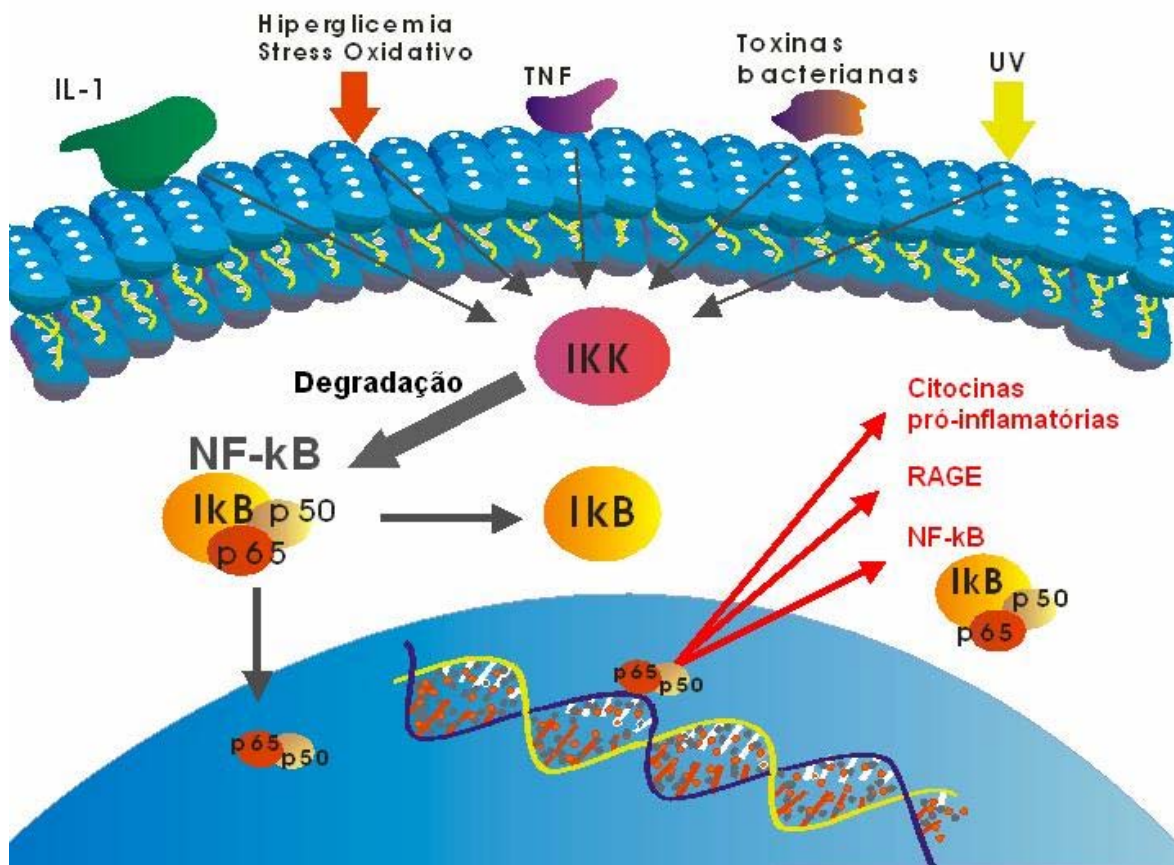
O NF- $\kappa$ B é um peptídeo heterodímero presente no citoplasma celular em sua forma inativa, sendo constituído por duas subunidades denominadas p50 e p65 conjugadas a uma subunidade protéica inibitória denominada I $\kappa$ B. As subunidades p50 e p65 contêm domínios de transativação para a indução gênica e são consideradas as formas ativas mais prevalentes do NF- $\kappa$ B (Tak e Firestein, 2001). A subunidade inibitória I $\kappa$ B é composta por diversas proteínas sendo as principais I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$ . I $\kappa$ B $\alpha$  está associada à ativação transitória do NF- $\kappa$ B enquanto que I $\kappa$ B $\beta$  sustenta vias de ativação prolongada (Baldwin, 1996; Chen F et al., 1999; DiDonato et al., 1997).

A expressão de proteínas do NF- $\kappa$ B promove respostas específicas a determinados estímulos como, por exemplo, a regulação na expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, ativação de genes moduladores inflamatórios como a IL1e TNF- $\alpha$ , além de importante papel na defesa contra patógenos (Tak e Firestein, 2001).

O NF- $\kappa$ B é um importante mediador das respostas inflamatórias, imunes e de apoptose, mediando a síntese de diversas citocinas tais como, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, bem como a expressão de ciclooxigenase 2 (Shishodia e Aggarwal, 2002). As diferentes respostas moduladas pela ativação e interação das proteínas do NF- $\kappa$ B promovem respostas celulares a estímulos externos em tempo apropriado por meio da ativação de genes adequados (Tak e Firestein, 2001). Alterações na regulação do NF- $\kappa$ B estão associadas a diversas doenças crônicas como DM, aterosclerose, artrite reumatóide e asma (Barnes e Karin, 1997; Evans et al., 2002; Mercurio e Manning, 1999).

A ativação do NF- $\kappa$ B pode ser induzida por uma grande variedade de estímulos exógenos e endógenos, incluindo hiperglicemia, o “stress” oxidativo mediado pelo acúmulo de radicais livres, acúmulo de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , a ligação do AGEs com seu receptor RAGE, infecções virais e radiação ultravioleta (Barnes e Karin, 1997; Tak e Firestein, 2001; Verma, 2004).

As vias de ativação do NF- $\kappa$ B envolvem a degradação da subunidade inibitória I $\kappa$ B induzida por processos de fosforilação mediados por serina quinases denominadas IKKs. Este evento determina a translocação do restante da molécula de NF- $\kappa$ B, em sua forma ativa para o núcleo. No núcleo o NF- $\kappa$ B regula a expressão de um grande número de genes, incluindo fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e RAGE. Muitos produtos dos genes regulados pelo NF- $\kappa$ B também funcionam como seus próprios ativadores como VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e RAGE. (DiDonato et al., 1997; Karin, 1999). A figura abaixo ilustra as vias de sinalização celular do NF- $\kappa$ B.



**Figura 3-** Vias de ativação do NF-κB. Representação esquemática da translocação nuclear da molécula de NF-κB ativada frente diversos estímulos como hiperglicemia, “stress” oxidativo, infecção, citocinas e radiação ultravioleta. No núcleo o NF-κB promove a transcrição de diversos moduladores como citocinas pró-inflamatórias e RAGE.

Doenças degenerativas crônicas como DM, aterosclerose e Alzheimer apresentam associação com aumento do “stress” oxidativo celular decorrente do acúmulo de radicais livres. Tal fato indica a relevância de sistemas de transdução como NF-κB, capazes de transformar a ação fugaz dos radicais livres em sinais de ativação celular duradouros (Bierhaus et al., 2001).



Pacientes diabéticos apresentam uma correlação entre a ativação do NF- $\kappa$ B em células mononucleares do sangue periférico com a qualidade do controle glicêmico, bem como a atividade do NF- $\kappa$ B e a gravidade da albuminúria em portadores de complicações renais decorrentes de DM (Chen S et al., 2003; Evans et al., 2002; Hofmann et al., 1999).

A expressão aumentada de NF- $\kappa$ B associada à proliferação de células endoteliais sugere ainda a participação deste fator nos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na retinopatia diabética proliferativa (Chen S et al., 2003; Mitamura et al., 2003).

A identificação do NF- $\kappa$ B como possível modulador de diversos eventos fisiopatológicos torna a inibição de sua ação um possível alvo terapêutico (Verma, 2004). Entre as estratégias estaria a inibição da atividade das IKK $\beta$ , o bloqueio do NF- $\kappa$ B pela ação de oligonucleotídeos antisense específicos, com provável eficácia clínica, a partir de evidências em modelos animais de doença inflamatória (Tomita et al., 1999). Mais ainda, drogas para doenças inflamatórias apresentam ação nas vias de ativação do NF- $\kappa$ B. Corticoesteróides inibem a ativação do NF- $\kappa$ B, a sulfasalazina inibe a degradação das I $\kappa$ B $\alpha$ , a aspirina compete inibitoriamente com a IKK $\beta$  (Kitamei et al., 2006; Yamamoto e Gaynor, 2001).

As diferentes proteínas que compõem as I $\kappa$ Bs apresentam distribuição tissular distinta para regulação de diferentes genes através da inibição do NF- $\kappa$ B, tornando-se assim atrativos alvos terapêuticos (Baldwin, 1996; Chen F et al., 1999; DiDonato et al., 1997).

Os benefícios de terapias específicas para modulação da atividade do NF- $\kappa$ B se relacionam ainda com equilíbrio delicado entre a supressão da inflamação e a interferência em vias normais de funcionamento celular. A maior eficácia terapêutica e a menor toxicidade sistêmica poderiam ser conseguidas, provavelmente, através da ação em subunidades específicas, nas proteínas I $\kappa$ B ou nas quinases IKK que apresentam certa especificidade tissular (Kitamei et al., 2006; Yamamoto e Gaynor, 2001).

O entendimento sobre o acúmulo de AGEs, a expressão e ativação de NF- $\kappa$ B na GL e superfície ocular permitirá avaliar o papel dos mecanismos de “stress” oxidativo desencadeado pela hiperglicemia e sua associação com processos de sinalização e atividade celular dos tecidos oculares por meio do aumento da expressão de fatores inflamatórios como IL1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , contribuindo para identificar as vias moleculares envolvidas na disfunção lacrimal no DM e no envelhecimento.

A hipótese desse estudo é que o acúmulo de AGEs, a maior expressão e ativação de NF- $\kappa$ B na GL e superfície ocular induzem mecanismos de “stress” oxidativo desencadeado pela hiperglicemia e levam a processos de sinalização e atividade celular dos tecidos oculares, resultando no aumento da expressão de fatores inflamatórios como IL1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , e, por fim, contribuindo para a disfunção lacrimal no DM e no envelhecimento.



## ***2. OBJETIVOS***

- Comparar o filme lacrimal *in vivo* em ratos diabéticos, controles, senis e adultos jovens em resposta ao tempo de doença e avaliar as diferenças na quantidade (volume lacrimal) e qualidade (concentração de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e atividade de peroxidase) do filme lacrimal.
- Investigar a expressão de AGEs e NF- $\kappa$ B em GL e tecidos da superfície ocular de modelos animais de DM e senilidade.
- Caracterizar a distribuição imuno-histoquímica dos AGEs e RAGE em tecidos oculares de modelos animais de DM e senilidade.
- Investigar a presença de NF- $\kappa$ B em GLs e tecidos da superfície ocular e avaliar alterações na sua ativação em resposta ao DM e ao envelhecimento.



### ***3. METODOLOGIA***

### **3.1. Modelos animais**

Para os estudos comparando animais diabéticos com normoglicêmicos foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos adultos jovens (oito semanas), provenientes do CEMIB da Universidade Estadual de Campinas, tratados com estreptozotocina (Sigma, St Louis, MO, EUA), e controles da mesma idade foram tratados apenas com tampão citrato. A indução de DM foi feita com injeção endovenosa única de 58 mg/kg de estreptozotocina em tampão citrato de sódio 0,01 M, aplicada na veia caudal dos animais, após jejum de 12 horas. A coleta de lágrimas e extração de tecidos foi realizada após 10 semanas de indução com estreptozotocina.

Para os estudos, comparando animais senis, foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos adultos jovens de 2 meses e senis de 24 meses, provenientes do CEMIB da Universidade Estadual de Campinas, mantidos com dieta padrão e água *ad libitum*.

Os protocolos de estudo e o projeto seguiram as diretrizes da “Association for Research in Vision and Ophthalmology” e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Unicamp (protocolo número 454-1).

Glândulas lacrimais exorbitárias e tecidos oculares foram extraídos sob anestesia geral com tiopental sódico (Cristália, Itapira, SP, Brasil) na dose de 100 µg/Kg, de acordo com orientações de estudos pilotos e descrições prévias (Navia e Narkates, 1980).

### **3.2. Reagentes**

Todos os reagentes utilizados, exceto aqueles com outra procedência especificada, foram adquiridos da Sigma CO., St Louis, MO, EUA.

### **3.3. Determinação da glicemia sérica**

Para confirmar o perfil metabólico compatível com a normalidade e DM, amostras de sangue para medidas de glicose foram colhidas da veia caudal dos animais anestesiados com tiopental intraperitoneal, na dose de 100 µg/Kg, dos diferentes grupos. As amostras foram analisadas, usando-se o método colorimétrico da glicose oxidase (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) e os valores de absorbância obtidos foram avaliados por espectrofotometria (espectrofotômetro Fentro 432, São Paulo, SP, Brasil) e comparados a valores de uma curva-padrão.

### **3.4. Teste de tolerância à insulina (kITT)**

As amostras de sangue para medidas de glicose foram colhidas da veia caudal dos animais anestesiados no tempo 0 (basal) e após 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos subsequentes à injeção endovenosa de 10 µM de insulina (Rocha et al., 2002; Saad et al., 1997).

Teste de tolerância à insulina foi realizado através da análise do tempo de decaimento da glicose plasmática obtido através da fórmula  $0,693/t^{1/2}$  para determinar a resistência à insulina. O tempo de decaimento da glicose plasmática em resposta à insulina  $t^{1/2}$  foi calculado por meio de regressão linear das curvas de decaimento da concentração de glicose obtidas nos experimentos.

### **3.5. Determinação do volume lacrimal e da concentração de IL-1β e TNF-α na lágrima**

A secreção lacrimal dos grupos estudados foi obtida através de coleta direta do menisco lacrimal inferior de animais anestesiados, com a utilização de micropipetas (Eppendorf Research, Hamburg, Alemanha) para aferição do volume. A concentração de IL-1β e TNF-α obtida nas amostras de lágrima dos animais diabéticos, senis e controles foi obtida através da utilização de kits ELISA ER21C1B (Pierce Endogen, Rockford, IL, EUA) conforme as instruções do fabricante.

### 3.6. Atividade de peroxidase

Para comparar a atividade de peroxidase foram utilizadas amostras de GL de animais diabéticos, após 10 semanas de indução com estreptozotocina, controles, senis e adultos jovens, homogeneizadas em solução Hanks a 4°C (n=5/grupo). Homogeneizados foram centrifugados a 10.000g por 8 min, para remoção de membranas e organelas celulares. A concentração de proteínas no sobrenadante foi medida através do método do biureto (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) e as amostras obtidas para concentração protéica de 100 µg/ml completadas com solução Hanks. Foi adicionada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para concentração final de 2.3 mM em cada amostra.

Foram coletadas alíquotas nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40 e 60 minutos e a atividade de peroxidase medida através de reação colorimétrica (Glucose GODPAP, Laborlab, Brasil), comparada com curva-padrão. Os valores obtidos foram analisados através de curva exponencial de decaimento de acordo com a fórmula  $(t) = [H_2O_2]_{t=0} \times e^{-kt}$ . A atividade de peroxidase de cada amostra foi representada através do valor k (constante de decaimento) obtido (Stoppiglia et al., 2002).

### 3.7. Soluções utilizadas nos experimentos

#### “Western blot”

Tampão de extração: utilizado para homogeneização de tecidos e extração de proteínas. Composta de: 100 mM Trisma base, pH 7,5, 10 mM EDTA, 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM NaF, 10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM PMSF diluído em álcool etílico, 1% Triton X-100 e 0,1 mg/ml aprotinina. Esta solução foi preparada e mantida no gelo durante todo o experimento. Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> e PMSF foram acrescentados ao tampão somente no momento de uso.

Tampão de Laemmli: utilizado para armazenar as proteínas extraídas e sua posterior aplicação em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para eletroforese. Composto de: 0,1 % azul de bromofenol, 1 M fosfato de sódio, pH 7,0, 50% glicerol e 10% SDS.



Tampão para SDS-PAGE, gel da fase de resolução “Resolving”: utilizado para confecção do gel de resolução. Composto de: 4 mM EDTA, 2% SDS e 750 mM Trisma base, pH 8,9 (ajustado com HCl).

Tampão para SDS-PAGE, gel da fase de empilhamento “Stacking”: utilizado para confecção de empilhamento de proteínas. Composto de: 4 mM EDTA, 2% SDS e 50 mM Trisma base, pH 6,7 (ajustado com ácido fosfórico).

Tampão para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): utilizado na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Composto de: 200 mM Trisma base, 1,52 M glicina, 7,18 M EDTA e 0,4% SDS. Para uso, a solução foi diluída 1:4.

Tampão para transferência: utilizado na transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Composto de: 25 mM Trisma base, 192 mM glicina, 20% Metanol e 0,02% SDS para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Mantido a 4°C.

Solução basal: utilizada no manuseio da membrana de nitrocelulose após a transferência. Composta de: 150 mM NaCl, 10 mM Trisma base e 0,02% Tween 20.

Solução bloqueadora: utilizada para diminuir ligações inespecíficas na membrana de nitrocelulose após a transferência. Composta de: 5% BSA em solução basal.

Solução de anticorpo: solução contendo anticorpos específicos para marcação de proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Composta de: 3% BSA em solução basal e os anticorpos na diluição estabelecida.

Solução de Iodo ( $^{125}\text{I}$ ): solução que permite a visualização das bandas de proteínas em auto-radiografia. Composta de: 1% BSA dissolvido em solução basal mais 2  $\mu\text{Ci}$  de proteína A marcada com  $^{125}\text{I}$ .

### **Fracionamento subcelular**

Tampão A para fracionamento subcelular: utilizado para separação das frações celulares (núcleo e citoplasma). Composto de: 0,32 M sacarose, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM NaF, 100 mM Pirofosfato de sódio, 100 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF e 0,1 mg/ml aprotinina.

Tampão B para fracionamento subcelular: utilizado na purificação da fração nuclear. Composto de: 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 200 mM EDTA, 10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 100 mM NaF, 100 mM pirofosfato de sódio e 0,1 mg/ml aprotinina.

### **Imuno-histoquímica**

Tampão fosfato salina (PBS) 0,1 M, pH 7,4: composto de 0,2 M fosfato de sódio dibásico acrescido de 0,2 M fosfato de sódio monobásico até atingir pH 7,4. Diluída em 0,3 M NaCl.

Solução bloqueadora: utilizada no bloqueio de ligações inespecíficas. Composta de: 3% leite em pó desnatado diluído em PBS 0,1 M, pH 7,4.

Solução de anticorpo: solução contendo anticorpos específicos para marcação de proteínas. Composta de: 1% BSA diluída em PBS 0,1M, pH 7,4, à qual se adiciona o anticorpo na diluição específica.

### **3.8. Fracionamento subcelular**

As GLs extraídas foram submetidas à homogeneização em tampão A composto por 0,32M sacarose, 20mM Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 100mM NaF, 100 mM pirofostato de sódio, 100 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF e 0,1 mg/ml aprotinina, a 4 °C, utilizando-se um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S, modelo PT 10/35 (Brikmann Instruments, Westbury, NY, EUA) operado em velocidade máxima por 30 segundos. A seguir, as amostras foram submetidas à centrifugação (1.000 x g, 25 minutos, 4 °C) a fim de se obter a separação das frações.

O “pellet” resultante, correspondente à fração nuclear foi ressuspenso em tampão B composto de 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 200 mM EDTA, 10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 100 mM NaF, 100 mM pirofosfato de sódio e 0,1 mg/ml de aprotinina, mantido no gelo por 30 minutos e centrifugado (15.000 x g, 30 minutos, 4 °C) e o sobrenadante retirado e mantido no gelo, obtendo-se a fração nuclear.

O sobrenadante resultante da primeira centrifugação foi ultracentrifugado (100.000 x g, 60 minutos, 4 °C) a fim de se obter a fração citoplasmática, a qual foi retirada e armazenada no gelo. Parte das frações obtidas foi submetida à determinação do conteúdo de proteínas totais pelo método fotolorimétrico de biureto, (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) e os valores de absorvância obtidos foram avaliados por espectrofotometria (espectrofotômetro Fentro 432, São Paulo-SP, Brasil), enquanto que outra parte foi submetida a “western blot” conforme descrito a seguir (Gasparetti et al., 2003).

### **3.9. “Western blot”**

A técnica de “western blot” foi usada para identificar a expressão de NF-κB em GLs dos diferentes grupos, além de córnea, conjuntiva de animais controle. As amostras colhidas sob anestesia com tiopental intraperitoneal (dose 100µg/Kg) foram homogeneizadas por sonicação, utilizando-se um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S, modelo PT 10/35 (Brikmann Instruments, Westbury, NY, EUA) 6 pulsos de 5 segundos com 5 segundos de intervalo entre os pulsos. Os extratos foram centrifugados a 1.5000 rpm 4 °C por 45 min para remoção do material insolúvel. As amostras foram tratadas com tampão Laemmli contendo DDT 10 mM, aquecidas em água fervente por 5 min. Parte deste foi utilizado para determinação do conteúdo das proteínas totais através do método fotolorimétrico de biureto, enquanto que a outra parte foi submetida à “immunoblotting” com anticorpos específicos.

### Eletoforese em gel de poliacrilamida:

Géis de poliacrilamida foram preparados em duas fases. A fase de empilhamento, foi disposta superiormente, 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 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, à medida que as amostras passavam da fase de empilhamento para a fase de resolução, segundo o método já descrito (Bradford, 1976)

### Transferência e “immunoblotting”

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 (Towbin, 1979). 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 descrita 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 a quantificação foi feita pelo programa de computador NIH Image Analysis (Scion Image [www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com) Bethesda, MD, EUA).

### **3.10. Imuno-histoquímica**

A fim de localizar histologicamente e observar a distribuição do NF- $\kappa$ B, AGE e RAGE em GLs e córnea nas diferentes condições de estudo, amostras de tecidos foram submetidas à avaliação por imunofluorescência.

As amostras de GL e globo ocular congeladas foram colocadas em formas embebidas em OCT-tissue-tek (Sakura FineTek Inc., Torrance, CA, EUA), congeladas em nitrogênio líquido, resfriadas a -20 °C, seccionadas em cortes de 7  $\mu$ m, transferidas para lâminas de microscopia (Perfecta, São Paulo, SP, Brasil) previamente tratadas com polilisina-L e armazenadas a -80 °C.

Essas secções foram fixadas em solução de acetona gelada por 10 minutos a TA. Em seguida foram incubadas com solução bloqueadora de BSA 3%, por 60 minutos, à TA, a fim de se evitar ligações inespecíficas. As lâminas foram lavadas em solução tampão fosfato (PBS), contendo 50mM de fosfato de sódio, 150mM de cloreto de sódio, com pH ajustado para 7,4. Os cortes foram então incubados com o anticorpo primário IgG policlonal de coelho anti-NF- $\kappa$ B p65 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, EUA), monoclonal de rato anti-AGE 6D12 (Research Diagnostic Inc., Flanders, NJ, EUA) e policlonal de coelho anti-RAGE (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, EUA), na

concentração de 4 $\mu$ g/ $\mu$ l em solução de BSA 1% em PBS, mantidos em câmara úmida e fechada por 12 horas, a 4 °C. Os cortes para controle negativo receberam somente a solução de anticorpo sem adição deste. Após nova lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas em solução de anticorpo contendo o anticorpo secundário IgG anti-coelho ou anti-rato conjugado com FITC na concentração de 375  $\mu$ g/ $\mu$ l em solução BSA 1% (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc, West Grove PA, EUA), por 2 horas à TA. Os cortes foram novamente lavados e em seguida foram contra corados por 45 minutos no escuro com faloidina a 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l. As lâminas foram montadas utilizando-se o meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA). As imagens foram obtidas utilizando-se microscópio confocal de fluorescência Zeiss Axiovert 200M (Zeiss, Wetzlar, Alemanha), e analisadas com o programa LSM 510 V 3.2.

### **3.11. Análise estatística**

Os dados referentes ao volume e concentração de citocinas nas lágrimas, a glicemia e medidas de espectrofotometria dos grupos em estudo, foram expressos como média e erro-padrão (média  $\pm$  erro padrão).

Os dados de densitometria foram normalizados pelo valor expresso nos controles (definido como 100%), e expressos como média  $\pm$  erro-padrão.

As diferenças das médias foram comparadas pelo teste Mann-Whitney U para variáveis não paramétricas, utilizando o programa Origin 6.0 (Microcal Software, Inc, Northampton, Massachusetts, EUA). Valores de P<0,05 foram considerados significativos.



## ***4. RESULTADOS***

Após tratamento com estreptozotocina, os animais apresentaram-se significativamente hiperglicêmicos, quando comparados aos controles tratados apenas com tampão citrato ( $P=0,01$ ). Os valores da redução da glicose plasmática ( $K_{ITT}$ ) no grupo senil foram menores do que nos animais adultos jovens, revelando resistência a insulina naqueles ( $P=0,01$ ) (Tabela 1).

O peso médio da GL (PGL) foi significativamente menor nos diabéticos do que nos controles da mesma idade ( $P=0,01$ ), bem como, o peso corporal (PC) ( $P=0,01$ ) e a relação PGL/PC. (Tabela 1).

Nos animais senis, o PGL foi significativamente maior do que nos adultos jovens ( $P=0,01$ ), da mesma forma o PC ( $P=0,01$ ) e a relação PGL/PC ( $P=0,04$ ). (Tabela 2)

#### **4.1. Volume lacrimal, concentração de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ e atividade de peroxidase**

O volume lacrimal medido 10 semanas após a indução de DM com estreptozotocina foi significativamente menor nos animais diabéticos ( $P=0,02$ ) e nos animais senis do que nos seus respectivos controles ( $P=0,016$ ).

Por outro lado, as concentrações de IL-1  $\beta$  e de TNF- $\alpha$  na lágrima dos animais diabéticos foram significativamente maiores do que nos controles ( $P=0,01$  e  $P=0,03$ , respectivamente).

Nos animais senis, as concentrações de IL-1  $\beta$  na lágrima foram significativamente maiores do que nos controles ( $P=0,01$ ) e de TNF- $\alpha$  apresentou uma tendência, ainda que não significativa de aumento em relação aos seus controles ( $P=0,05$ ).

A média dos valores k de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, relacionados à atividade de peroxidase em homogeneizados de GL foi similar em diabéticos e controles ( $P=0,34$ ). Por outro lado, a atividade de peroxidase na GL foi duas vezes maior no grupo de adultos jovens do que no senil ( $P=0,02$ ) (Tabelas 1 e 2).



Campinas, 2006

**Tabela 1.** Efeito do DM, 10 semanas após indução com estreptozotocina em ratos Wistar machos, nos níveis de glicose sérica (mg/dl), peso corporal (g), peso da GL (mg), volume basal de lágrima ( $\mu$ l) de animais diabéticos e controles.

	<b>Diabético</b>		<b>Controle</b>	
	<i>n</i>		<i>n</i>	
<b>Glicemia sérica (mg/dl)</b>	15	620,66 $\pm$ 8,21 *	15	162,89 $\pm$ 9,61
<b>Peso corporal (PC)(g)</b>	5	256,00 $\pm$ 8,62 *	5	349,00 $\pm$ 7,79
<b>Peso GL (PGL) (mg)</b>	5	67,80 $\pm$ 7,59 *	5	134,20 $\pm$ 9,43
<b>PGL/PC (mg/g)</b>	5	0,06 $\pm$ 0,03 *	5	0,38 $\pm$ 0,3
<b>Volume lacrimal (<math>\mu</math>l)</b>	10	0,97 $\pm$ 0,62 *	10	1,64 $\pm$ 0,93

Campinas, 2006

**Tabela 2.** Efeito do DM, 10 semanas após indução com estreptozotocina em ratos Wistar machos na concentração de IL-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$  (pg/ml) na lágrima e atividade de peroxidase ( $\text{min}^{-1}$ ) ( $\mu$ l) na GL de animais diabéticos e controles.

	<b>Diabético</b>		<b>Controle</b>	
	<i>n</i>		<i>n</i>	
<b>IL-1<math>\beta</math> (pg/ml)</b>	5	10,12 $\pm$ 1,24 *	5	4,26 $\pm$ 0,18
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	5	160,92 $\pm$ 35,89 *	5	57,32 $\pm$ 12,68
<b>Atividade de Peroxidase (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>	5	0,05 $\pm$ 0,02	5	0,033 $\pm$ 0,006

Campinas, 2006

**Tabela 3.** Efeito da senilidade em ratos Wistar machos, teste de tolerância à insulina - kITT, peso corporal (g), peso da GL (mg), volume basal de lágrima ( $\mu\text{l}$ ) de animais senis e adultos jovens.

	Senil		Adulto jovem	
	<i>n</i>		<i>n</i>	
<b>kITT</b>	5	3,15 $\pm$ 0,04 *	5	4,65 $\pm$ 0,05
<b>Peso corporal (PC) (g)</b>	5	408,80 $\pm$ 18,17*	5	280,80 $\pm$ 4,46
<b>Peso GL (PGL) (mg)</b>	5	142,60 $\pm$ 12,75 *	5	77,20 $\pm$ 4,09
<b>PGL/PC (mg/g)</b>	5	0,34 $\pm$ 0,023 *	5	0,27 $\pm$ 0,012
<b>Volume lacrimal (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	10	2,40 $\pm$ 0,25 *	10	3,96 $\pm$ 0,42

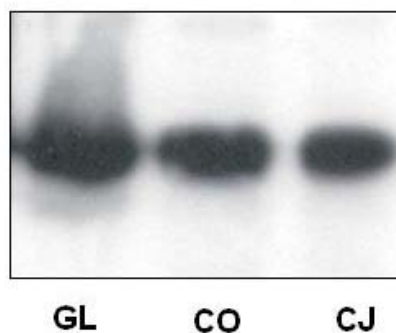
Campinas, 2006

**Tabela 4.** Efeito da senilidade em ratos Wistar machos na concentração de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (pg/ml) na lágrima, atividade de peroxidase ( $\text{min}^{-1}$ ) ( $\mu\text{l}$ ) na GL de animais senis e controles.

	Senil		Controle	
	<i>n</i>		<i>n</i>	
<b>IL-1<math>\beta</math> (pg/ml)</b>	5	6,22 $\pm$ 0,15 *	5	4,26 $\pm$ 0,18
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	5	239,10 $\pm$ 50,02	5	57,32 $\pm$ 12,68
<b>Atividade de Peroxidase (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>	5	0,016 $\pm$ 0,013 *	5	0,033 $\pm$ 0,006

## 4.2. Expressão de NF- $\kappa$ B

A expressão das proteínas de NF- $\kappa$ B foi positiva em amostras de GL, córnea e conjuntiva de animais jovens (oito semanas), detectada através de “western blot” como mostra a figura abaixo:

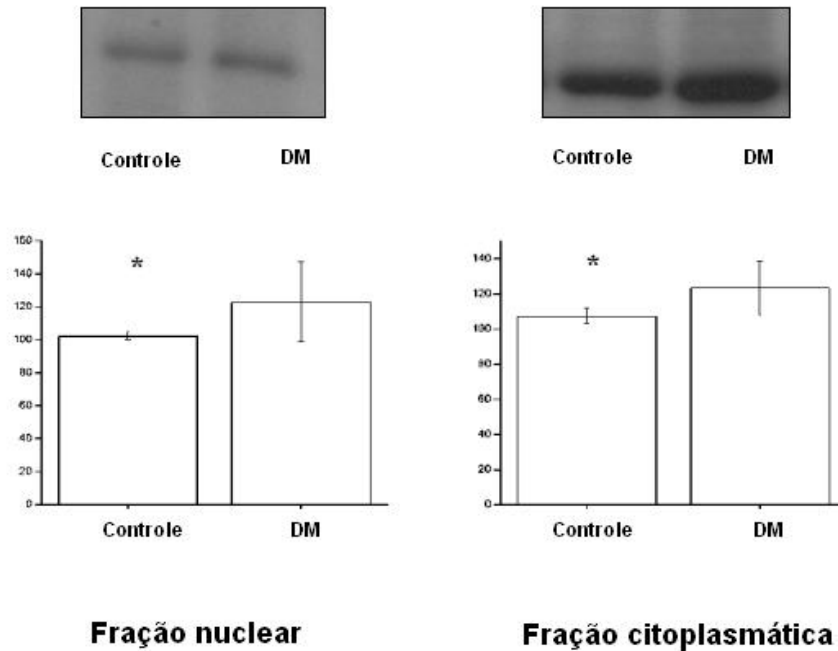


**Expressão das proteínas de NF- $\kappa$ B positiva em amostras de Glândula Lacrimal (GL), córnea (CO) e conjuntiva (CJ) de animais jovens (8 semanas)**

**Figura 4.** Expressão de NF- $\kappa$ B em córnea (CO), conjuntiva (CJ) e glândula lacrimal (GL) de animais jovens. Os tecidos foram extraídos e avaliados por “western blotting”.

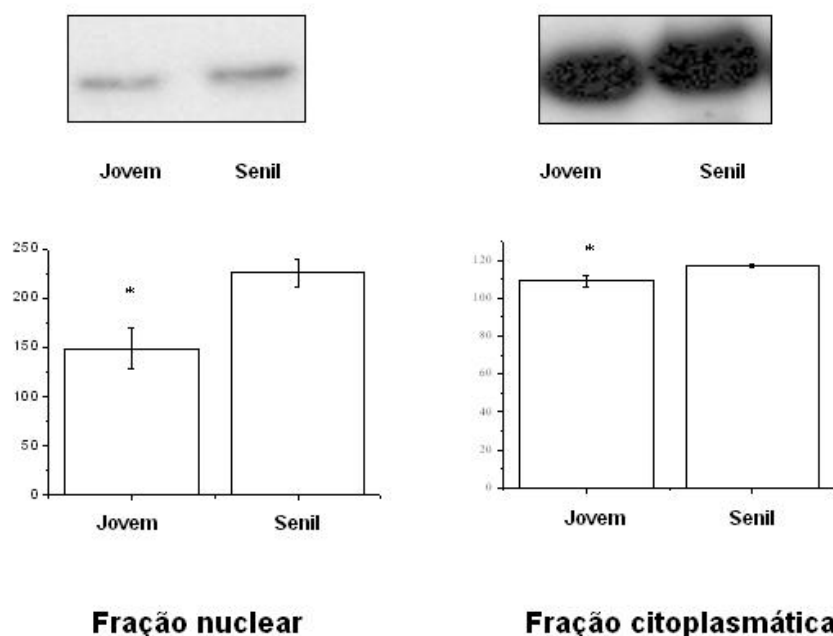
As proteínas NF- $\kappa$ B foram detectadas em frações nuclear e citoplasmática de extratos de GL submetidos a fracionamento subcelular e demonstraram maior expressão em animais diabéticos (Figura 5) e senis (Figura 6) comparados aos controles e adultos jovens. (n=6 animais/grupo) ( $P=0,02$  e  $P=0,02$  respectivamente)

## Expressão e ativação do NF- $\kappa$ B em frações nuclear e citoplasmática de GL de animais controle e diabéticos



**Figura 5.** Expressão e ativação do NF- $\kappa$ B em frações nuclear e citoplasmática de GL de animais diabéticos, controles. Após extração, separação das frações nuclear e citoplasmática e normalização pela concentração protéica, amostras de GLs foram comparadas por “western blotting”, (n=6 animais/grupo) ( $P=0,02$ ).

## Expressão e ativação do NF- $\kappa$ B em frações nuclear e citoplasmática de GL de animais adultos jovens e senis



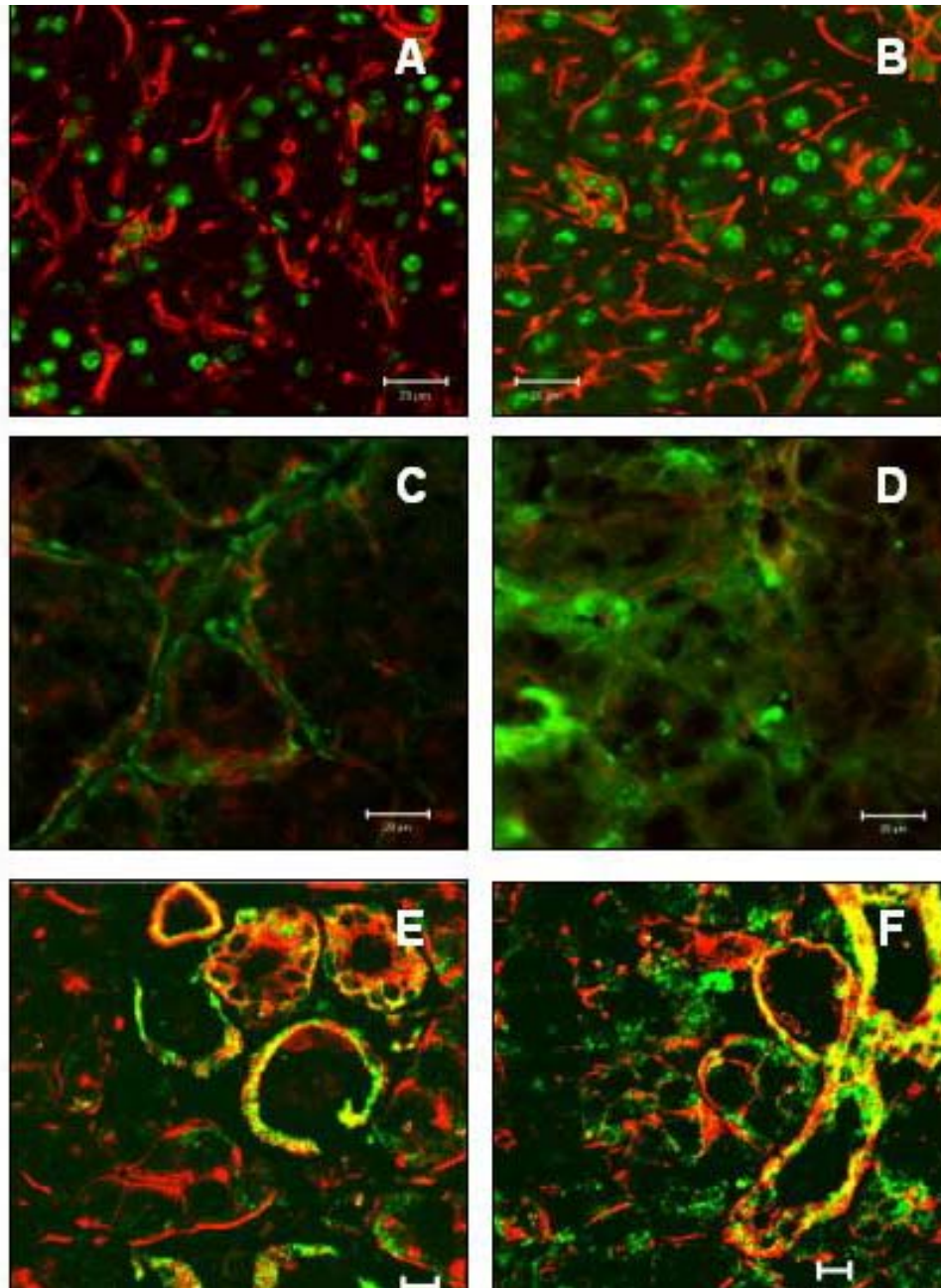
**Figura 6.** Expressão e ativação do NF- $\kappa$ B em frações nuclear e citoplasmática de GL de animais senis e adultos jovens. Após extração, separação das frações nuclear e citoplasmática e normalização pela concentração protéica, amostras de GLs foram comparadas por “western blotting”, (n=6 animais/grupo) ( $P=0,02$ ).

### 4.3. Localização imuno-histoquímica dos NF- $\kappa$ B, AGEs e RAGE

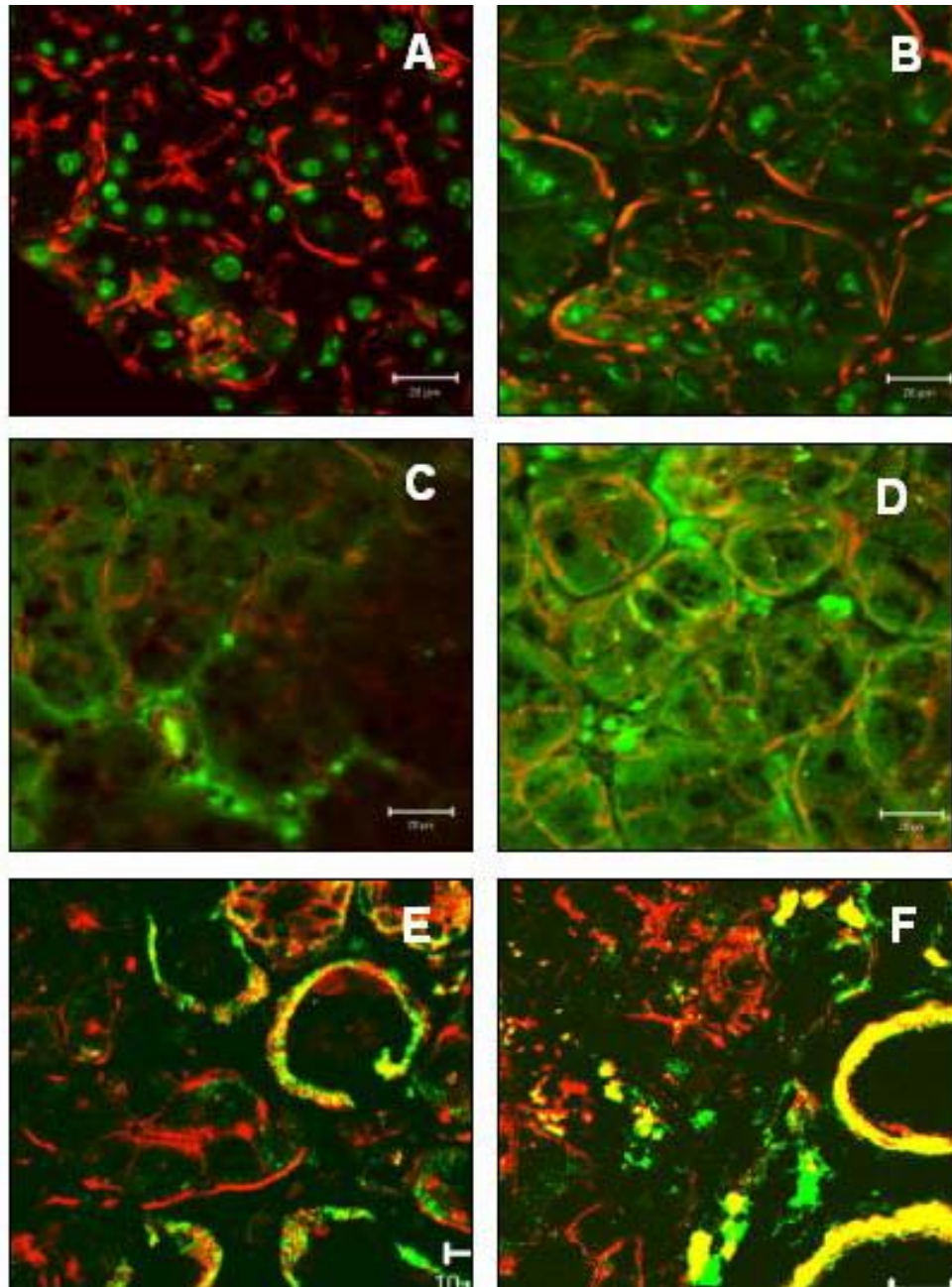
Experimentos de imunofluorescência com laser confocal demonstraram localização nuclear e citoplasmática de NF- $\kappa$ B nas células acinares de GL, com maior expressão nos diabéticos (Figuras 7A e B) e senis (Figuras 8A e B), quando comparados aos animais controles e adultos jovens.

A expressão de AGEs foi observada em amostras na membrana basal e tecido conectivo de GL com coloração mais intensa nos animais diabéticos (Figuras 7 C e D) e senis (Figuras 8 C e D).

As proteínas RAGE foram também identificadas nos tecidos de GL, predominantemente nas membranas citoplasmáticas dos ductos glandulares também com maior expressão em diabéticos (Figuras 7 E e F) e senis (Figuras 8 E e F) do que em controles e adultos jovens.



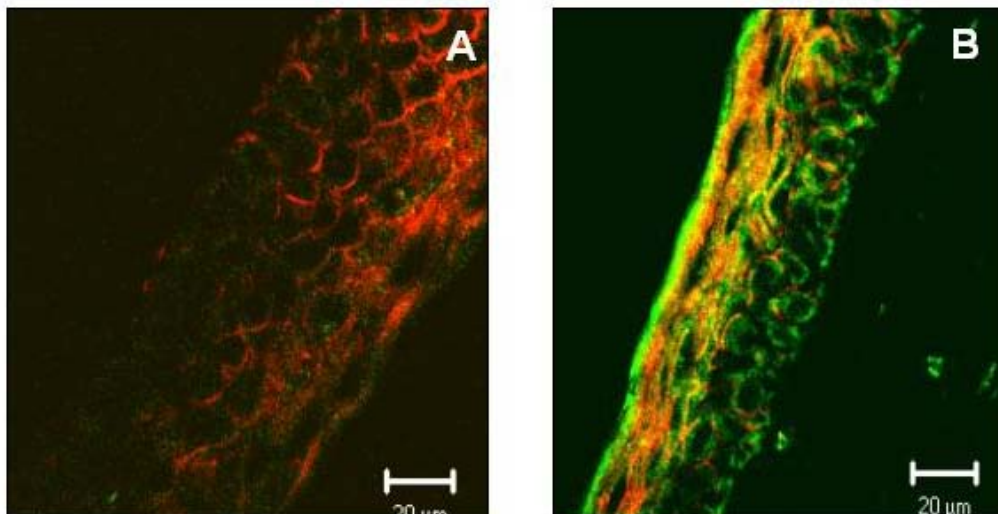
**Figura 7.** Microscopia confocal com imunofluorescência, demonstrando a localização e expressão nuclear e citoplasmática de NF- $\kappa$ B (verde) nas células acinares de GL de animais controle (A) e diabéticos (B), de AGEs (verde) na membrana basal e tecido conectivo de GL nos animais controle (C) e nos diabéticos (D) e das proteínas RAGE (verde) nos ductos glandulares de animais controle (E) e diabéticos (F). Contracoloração com faloidina (vermelho) indicando a localização da actina nas membranas epiteliais.



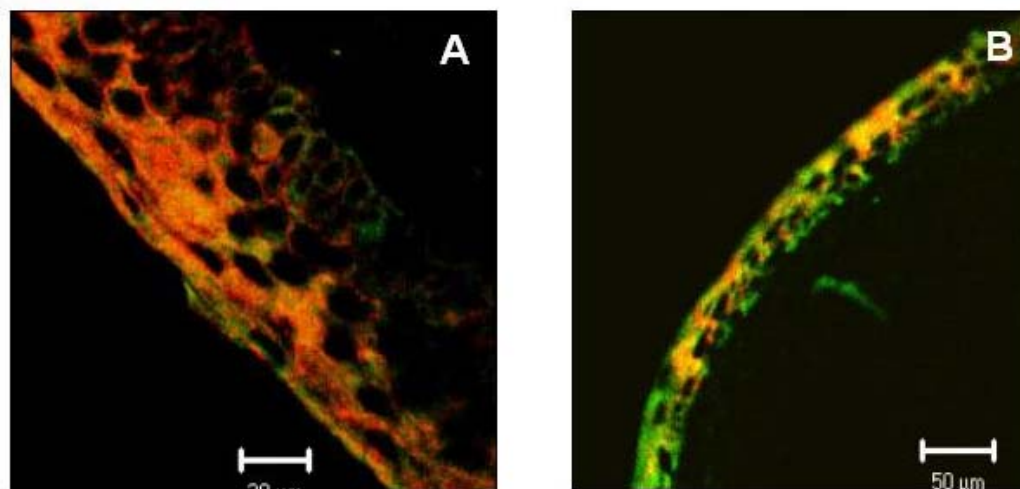
**Figura 8.** Microscopia confocal com imunofluorescência, demonstrando a localização e expressão nuclear e citoplasmática de NF- $\kappa$ B (verde) nas células acinares de GL de animais adultos jovens (A) e senis (B), de AGEs (verde) na membrana basal e tecido conectivo de GL nos animais adultos jovens (C) e nos senis (D) e das proteínas RAGE (verde) nos ductos glandulares de animais adultos jovens (E) e senis (F). Contracoloração com faloidina (vermelho) indicando a localização da actina nas membranas epiteliais.



A expressão de RAGE no epitélio corneano foi também mais intensa nos animais diabéticos (Figura 9) e senis (Figura 10) comparados com controles e adultos jovens.



**Figura 9.** Microscopia confocal com imunofluorescência, demonstrando a expressão de RAGE (verde) nas células epiteliais da córnea de animais controle (A) e diabéticos (B). Contracoloração com faloidina (vermelho) indicando a localização da actina nas membranas epiteliais.



**Figura 10.** Microscopia confocal com imunofluorescência, demonstrando a expressão de RAGE (verde) nas células epiteliais da córnea de animais adultos jovens (A) e senis (B). Contracoloração com faloidina (vermelho) indicando a localização da actina nas membranas epiteliais.



## ***5. DISCUSSÃO***

O DM, cujos dois pilares fisiopatológicos estão relacionados à redução da secreção da insulina e/ou a dificuldade desse hormônio transmitir o seu sinal para o intracelular dos tecidos-alvo, vem ganhando importância tanto no que diz respeito à prevalência, quanto à importância de suas complicações (King et al., 1998; Moller e Flier, 1991; Zimmet et al., 2001).

Alterações morfológicas e secretórias das GLs e da superfície ocular associadas a manifestações de olho seco têm sido correlacionadas a complicações do DM (Azar et al., 1992; Dogru, 2000; Dogru et al., 2001; Goebbels, 2000; McNamara et al., 1998; Ramos-Remus et al., 1994) e aos processos de envelhecimento (Bromberg e Welch, 1985; Draper et al., 1999; Draper et al., 2003; Mathers et al., 1996; McGill et al., 1984; Rocha et al., 2003). Entretanto, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas complicações oculares, principalmente relacionadas à superfície ocular, são pouco conhecidos.

Estudos anteriores reportaram o envolvimento do NF- $\kappa$ B, AGEs e RAGE como mediadores em diversas complicações relacionadas ao DM e envelhecimento, correlacionado ao aumento do “stress” oxidativo, disfunções de sinalização de hormônios e fatores de crescimento, recrutamento de mediadores pró-inflamatórios e dano vascular (Singh et al., 2001; Stitt, 2001; Vlassara et al., 1994; Zarina et al., 2000).

Neste estudo, utilizamos modelos animais de DM e de envelhecimento com o objetivo de melhor compreender a fisiopatologia das disfunções da superfície ocular associadas a estas condições.

A estreptozotocina é um agente alquilante amplamente utilizado para indução de DM em modelos animais, em razão de sua capacidade de destruir seletivamente as células  $\beta$  pancreáticas produtoras de insulina (Weis e McConnell, 1982). Os animais diabéticos apresentaram menor peso corporal e menor peso das GLs comparados com controles, o que reflete mecanismos de proteção de tecidos nobres através da redução do uso periférico da insulina, diminuição da atividade metabólica e disfunção das vias relacionadas a fatores de crescimento.

Animais senis apresentam maior peso corporal e maior peso da GL e resistência à insulina, comparados a adultos jovens, como demonstrado neste e em outros estudos (Rocha et al., 2003). O aumento da GL verificado nos animais senis, em contraste com a redução de parâmetros funcionais pode ser explicado pelo aumento de tecido conectivo e pela diminuição de tecido secretor, atividade metabólica, vias neuronais e vascularização da glândula relacionados aos processos de envelhecimento (Draper et al., 1999; Sullivan et al., 1990).

O DM e a senilidade interferem nas etapas iniciais da sinalização insulínica da GL (Rocha et al., 2003; Rocha et al., 2002; Rocha et al., 2000a) o que sugere a participação dos diversos moduladores de “stress” oxidativo, inflamação e dano tissular relacionados nas complicações do DM e nos processos de envelhecimento.

Com os modelos animais utilizados foram identificadas alterações funcionais no filme lacrimal como, diminuição de volume lacrimal e alterações na atividade de peroxidase, indicando uma diminuição na capacidade secretória da GL. Estes achados demonstram a presença de disfunções nos animais diabéticos e senis, análogas àquelas encontradas em experimentos anteriores com mesmo modelo animal e em humanos portadores de síndrome de olho seco (Goebbels, 2000; Mathers et al., 1996; Rocha et al., 2002).

A atividade de peroxidase em animais senis foi duas vezes menor em comparação a adultos jovens, o que reflete a menor capacidade secretória da glândula (Bromberg et al., 1989; Herzog et al., 1976). Entretanto, em animais diabéticos a atividade de peroxidase na glândula lacrimal foi maior que nos animais controle. Estudos recentes também demonstraram que modelos animais de DM induzido por estreptozotocina (Adeghate et al., 2005) e com supressão de andrógenos e hormônios da tireóide (Paliwal e De, 2006) apresentam, da mesma forma, maior atividade de peroxidase comparada a controles com atividade hormonal intacta. Esse aumento no DM, diferente da marcada redução na senilidade, pode estar associado a um período adaptativo em que o tecido procuraria reverter o processo oxidativo relacionado à hiperglicemia, mas que, provavelmente se deteriore com a progressão da doença e agravamento da disfunção secretora. De qualquer forma, fica demonstrado que o uso da atividade de peroxidase como marcador biológico de boa função da GL não se aplica a todas as doenças.

As concentrações mais elevadas de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na lágrima dos animais diabéticos e senis comparados com controles observadas nesse estudo, sugerem a participação desses mediadores nos mecanismos de dano celular relacionados ao DM e à senilidade levando a alterações de superfície ocular freqüentes nessas condições (Pflugfelder, 1998; Pflugfelder et al., 1999; Rocha et al., 1998; Solomon et al., 2001; Zoukhri, 2006; Zoukhri et al., 2002). Entretanto, a grande variação dos valores obtidos nos experimentos realizados para quantificação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  não permite uma boa quantificação da participação destes mediadores nas disfunções lacrimais estudadas. Como na medida da peroxidase, ficou clara a dificuldade de usar um marcador biológico como padrão de disfunção lacrimal entre os componentes do filme lacrimal.

A expressão de NF- $\kappa$ B foi demonstrada pela primeira vez, nesse estudo, em GLs e tecidos da superfície ocular de ratos. A expressão deste fator de sinalização, associado a mecanismos de lesão celular, encontra-se significativamente aumentada em animais diabéticos e senis comparados com os controles e adultos jovens. Estes achados foram demonstrados por meio das técnicas de “western blot” com fracionamento subcelular, onde tanto em amostras de extratos nuclear quanto extratos citoplasmáticos de GL verificou-se uma expressão significativamente mais alta do NF- $\kappa$ B nos animais diabéticos e senis comparados aos seus respectivos controles. Tais achados foram confirmados em estudos de microscopia confocal com imunofluorescência através da localização acinar do NF- $\kappa$ B e maior intensidade de fluorescência no núcleo e citoplasma dos grupos diabéticos e senis.

O aumento de NF- $\kappa$ B observado tanto no núcleo quanto no citoplasma das células acinares, implica na sustentação dos estímulos de “stress” oxidativo, hiperglicemia e transcrição de citocinas à ativação e a aumento de síntese deste fator. Estes resultados estão de acordo com a hipótese inicial de envolvimento do NF- $\kappa$ B nas disfunções da GL observadas no DM e na senilidade.

Assim, a ação sustentada do NF- $\kappa$ B nas vias inflamatórias reafirma o papel deste fator como importante mediador dos danos tissulares e nas complicações relacionadas ao DM e envelhecimento (Bierhaus et al., 2001).

A formação e acúmulo de AGEs é um evento fisiopatológico importante em diversas de doenças (Portero-Otin et al., 2002; Stitt, 2001; Vlassara et al., 1994). Os AGEs agem como mediadores, não apenas nas complicações do DM mas também em diversas alterações relacionadas ao envelhecimento (Vlassara et al., 1994) como perda elasticidade da pele (Monnier e Cerami, 1981), opacificação do cristalino (Das et al., 1998; Stevens et al., 1978), doença de Alzheimer (Munch et al., 1998) fibrose pulmonar (Matsuse et al., 1998) e aterosclerose (Naka et al., 2004; Stitt et al., 1997a).

Os tecidos oculares são profundamente afetados tanto pelo DM quanto pelo envelhecimento. A formação e o acúmulo de AGEs associada à produção de radicais livres e à ativação de moléculas de sinalização celular como citocinas e NF- $\kappa$ B tem sido proposta como importante via moduladora de disfunção nestes tecidos (Stitt, 2001).

Nos modelos animais de DM e senilidades estudados observamos a expressão mais intensa de AGEs e RAGE na GL e superfície ocular do que nos seus respectivos controles.

O anticorpo utilizado nos estudos de imunofluorescência para AGEs, o 6D12, reconhece duas estruturas antigênicas específicas dos AGEs, o CML e o CEL, ambos já correlacionados em estudos prévios, a complicações do DM e senilidade (Koito et al., 2004).

A expressão de AGEs e RAGE mais intensa na GL dos animais diabéticos e senis indica uma correlação com os eventos de glicosilação não enzimática decorrente do “stress” oxidativo e da hiperglicemia. Estas alterações sugerem uma correlação com as disfunções dos tecidos da superfície ocular de forma semelhante ao já descrito em outros tecidos (Brownlee, 2001).

A expressão de AGEs foi predominante nas células acinares da GL enquanto que a expressão do RAGE foi mais evidente nas células epiteliais dos ductos.

Em conjunto, estes dados sugerem que o mecanismo das disfunções da superfície ocular e, em especial do olho seco no DM, pode estar relacionado à ativação do NF- $\kappa$ B, aumento de AGEs e RAGE decorrentes da hiperglicemia crônica e “stress”

oxidativo. A ativação destes fatores de sinalização levaria à produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , acarretando a disfunção da GL. Essa hipótese é compatível com achados em outros órgãos estudados em pacientes e modelos animais de DM e senilidade (Brownlee, 2001; Evans et al., 2002; Rocha et al., 1998; Stitt, 2001; Vlassara et al., 1994).

Em resumo, este estudo apresenta provas funcionais da disfunção lacrimal no DM e senilidade e sugere que mecanismos de sinalização intracelular, envolvendo a ativação e translocação de NF- $\kappa$ B e acúmulo de AGEs e RAGE na GL e superfície ocular podem estar relacionados a essa disfunção. No futuro, essas informações poderão guiar o estudo de tratamentos específicos para as alterações do filme lacrimal e da superfície ocular no DM e na senilidade.



## ***6. CONCLUSÕES***



- Animais diabéticos e senis, comparados a controles e adultos jovens, apresentam alterações no filme lacrimal marcadas por de volume diminuído e concentrações aumentadas das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . A atividade de peroxidase na GL encontra-se diminuída em animais senis e aumentada nos diabéticos, demonstrando que o uso da atividade de peroxidase como marcador biológico de boa função da GL não se aplica a todas as condições.
- A expressão de NF- $\kappa$ B foi detectada em GL e tecidos da SO, e encontra-se aumentada tanto no núcleo quanto no citoplasma da GL de modelos animais de DM e senilidade, indicando a ativação desse mediador nessas condições.
- A expressão de AGEs foi detectada em GL de ratos, localizada principalmente na membrana basal e tecido conectivo acinar.
- A expressão de AGEs foi mais intensa em animais diabéticos e senis do que em controles e adultos jovens.
- A expressão de RAGE foi detectada em GL e córnea de ratos, localizada predominantemente nas membranas citoplasmáticas dos ductos da GL e no epitélio corneano.
- A expressão de RAGE foi mais intensa em animais diabéticos e senis do que em controles e adultos jovens.



## ***7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

Adeghate E, Ponery A, Hameed R. Notes on the effect of diabetes mellitus on the morphology and function of the rat lacrimal gland. *The Ocular Surface* 2005; 3: S42.

Ahmed N, Thornalley PJ, Dawczynski J, Franke S, Strobel J, Stein G, et al. Methylglyoxal-derived hydroimidazolone advanced glycation end-products of human lens proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44 (12): 5287-92.

Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med* 1997; 14 Suppl 5: S1-85.

Azar DT, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Gipson IK. Altered epithelial-basement membrane interactions in diabetic corneas. *Arch Ophthalmol* 1992; 110 (4): 537-40.

Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-83.

Bandeem-Roche K, Munoz B, Tielsch JM, West SK, Schein OD. Self-reported assessment of dry eye in a population-based setting. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38 (12): 2469-75.

Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336 (15): 1066-71.

Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40 (4): 405-12.

Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48 (1): 1-9.

Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med* 2005; 83 (11): 876-86.

Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, et al. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 2001; 50 (12): 2792-808.

Blay SL, Mari JJ, Ramos LR, Ferraz MP. The use of the Clinical Interview Schedule for the evaluation of mental health in the aged community. *Psychol Med* 1991; 21 (2): 525-30.

Boel E, Selmer J, Flodgaard HJ, Jensen T. Diabetic late complications: will aldose reductase inhibitors or inhibitors of advanced glycosylation endproduct formation hold promise? *J Diabetes Complications* 1995; 9 (2): 104-29.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.

Bromberg BB, Cripps MM, Welch MH. Peroxidase secretion by lacrimal glands from juvenile F344 rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30 (3): 562-8.

Bromberg BB, Welch MH. Lacrimal protein secretion: comparison of young and old rats. *Exp Eye Res* 1985; 40 (2): 313-20.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414 (6865): 813-20.

Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988; 318 (20): 1315-21.

Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90 (14): 6434-8.

Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, et al. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91 (20): 9441-5.

Cataldegirmen G, Zeng S, Feirt N, Ippagunta N, Dun H, Qu W, et al. RAGE limits regeneration after massive liver injury by coordinated suppression of TNF-alpha and NF-kappaB. *J Exp Med* 2005; 201 (3): 473-84.

Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999; 45 (1): 7-17.

Chen S, Khan ZA, Cukiernik M, Chakrabarti S. Differential activation of NF-kappa B and AP-1 in increased fibronectin synthesis in target organs of diabetic complications. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284 (6): E1089-97.

Crews DE, Zavotka S. Aging, disability, and frailty: implications for universal design. *J Physiol Anthropol* 2006; 25 (1): 113-8.

Cunha DA, Carneiro EM, Alves Mde C, Jorge AG, de Sousa SM, Boschero AC, et al. Insulin secretion by rat lacrimal glands: effects of systemic and local variables. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289 (5): E768-75.

Das BK, Sun TX, Akhtar NJ, Chylack LT, Jr., Liang JJ. Fluorescence and immunochemical studies of advanced glycation-related lens pigments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39 (11): 2058-66.

DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I-kappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 1997; 388 (6642): 548-54.

Doane MG. Interactions of eyelids and tears in corneal wetting and the dynamics of the normal human eyeblink. *Am J Ophthalmol* 1980; 89 (4): 507-16.

Dogru M. Tear secretion and tear film function in insulin dependent diabetics. *Br J Ophthalmol* 2000; 84 (10): 1210.

Dogru M, Katakami C, Inoue M. Tear function and ocular surface changes in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Ophthalmology* 2001; 108 (3): 586-92.

Draper CE, Adeghate EA, Singh J, Pallot DJ. Evidence to suggest morphological and physiological alterations of lacrimal gland acini with ageing. *Exp Eye Res* 1999; 68 (3): 265-76.

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

Eble AS, Thorpe SR, Baynes JW. Nonenzymatic glycosylation and glucose-dependent cross-linking of protein. *J Biol Chem* 1983; 258 (15): 9406-12.

Edelstein D, Brownlee M. Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. *Diabetes* 1992; 41 (1): 26-9.

The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993; 329 (14): 977-86.

Ehlermann P, Eggers K, Bierhaus A, Most P, Weichenhan D, Greten J, et al. Increased proinflammatory endothelial response to S100A8/A9 after preactivation through advanced glycation end products. *Cardiovasc Diabetol* 2006; 5 (1): 6.

Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002; 23 (5): 599-622.

Faria e Souza SJ, Romano ACO, Espana E, Yoo SH, Tseng SC, Gomes JAP. Anatomia Funcional da Superfície Ocular. In: Gomes Jap, Alves Mr. Superfície Ocular. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2006. p.3-13.

Fu MX, Wells-Knecht KJ, Blackledge JA, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW. Glycation, glycooxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes* 1994; 43 (5): 676-83.

Gasparetti AL, de Souza CT, Pereira-da-Silva M, Oliveira RL, Saad MJ, Carneiro EM, et al. Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. *J Physiol* 2003; 552 (Pt 1): 149-62.

Goebbels M. Tear secretion and tear film function in insulin dependent diabetics. *Br J Ophthalmol* 2000; 84 (1): 19-21.

Gupta A, Monroy D, Ji Z, Yoshino K, Huang A, Pflugfelder SC. Transforming growth factor beta-1 and beta-2 in human tear fluid. *Curr Eye Res* 1996; 15 (6): 605-14.

Habib T, Hejna JA, Moses RE, Decker SJ. Growth factors and insulin stimulate tyrosine phosphorylation of the 51C/SHIP2 protein. *J Biol Chem* 1998; 273 (29): 18605-9.

Handa JT, Verzijl N, Matsunaga H, Aotaki-Keen A, Luttj DA, te Koppele JM, et al. Increase in the advanced glycation end product pentosidine in Bruch's membrane with age. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40 (3): 775-9.

Heigle TJ, Pflugfelder SC. Aqueous tear production in patients with neurotrophic keratitis. *Cornea* 1996; 15 (2): 135-8.

Herzog V, Sies H, Miller F. Exocytosis in secretory cells of rat lacrimal gland. Peroxidase release from lobules and isolated cells upon cholinergic stimulation. *J Cell Biol* 1976; 70 (3): 692-706.

Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, et al. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappaB. *Diabetologia* 1999; 42 (2): 222-32.

Howes KA, Liu Y, Dunaief JL, Milam A, Frederick JM, Marks A, et al. Receptor for advanced glycation end products and age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45 (10): 3713-20.

Huang FC, Tseng SH, Shih MH, Chen FK. Effect of artificial tears on corneal surface regularity, contrast sensitivity, and glare disability in dry eyes. *Ophthalmology* 2002; 109 (10): 1934-40.

Hudson BI, Schmidt AM. RAGE: a novel target for drug intervention in diabetic vascular disease. *Pharm Res* 2004; 21 (7): 1079-86.

Hyndiuk RA, Kazarian EL, Schultz RO, Seideman S. Neurotrophic corneal ulcers in diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol* 1977; 95 (12): 2193-6.

Ishida N, Rao GN, del Cerro M, Aquavella JV. Corneal nerve alterations in diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol* 1984; 102 (9): 1380-4.

Kaiserman I, Kaiserman N, Nakar S, Vinker S. Dry eye in diabetic patients. *Am J Ophthalmol* 2005; 139 (3): 498-503.

Kaji Y, Amano S, Usui T, Oshika T, Yamashiro K, Ishida S, et al. Expression and function of receptors for advanced glycation end products in bovine corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44 (2): 521-8.

Kaji Y, Usui T, Oshika T, Matsubara M, Yamashita H, Araie M, et al. Advanced glycation end products in diabetic corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41 (2): 362-8.

Kalfa TA, Gerritsen ME, Carlson EC, Binstock AJ, Tsilibary EC. Altered proliferation of retinal microvascular cells on glycated matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36 (12): 2358-67.

Karin M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 1999; 18 (49): 6867-74.

Kasuga M, Hedo JA, Yamada KM, Kahn CR. The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. *J Biol Chem* 1982; 257 (17): 10392-9.



Kern TS, Tang J, Mizutani M, Kowluru RA, Nagaraj RH, Romeo G, et al. Response of capillary cell death to aminoguanidine predicts the development of retinopathy: comparison of diabetes and galactosemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41 (12): 3972-8.

King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; 21 (9): 1414-31.

Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, Nishida K, Yokoi N, Quantock AJ, et al. Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res* 2001; 20 (5): 639-73.

Kitamei H, Iwabuchi K, Namba K, Yoshida K, Yanagawa Y, Kitaichi N, et al. Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) with an inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), pyrrolidine dithiocarbamate. *J Leukoc Biol* 2006:

Koito W, Araki T, Horiuchi S, Nagai R. Conventional antibody against Nepsilon-(carboxymethyl)lysine (CML) shows cross-reaction to Nepsilon-(carboxyethyl)lysine (CEL): immunochemical quantification of CML with a specific antibody. *J Biochem (Tokyo)* 2004; 136 (6): 831-7.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404 (6778): 635-43.

Kume S, Takeya M, Mori T, Araki N, Suzuki H, Horiuchi S, et al. Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am J Pathol* 1995; 147 (3): 654-67.

Lee AJ, Lee J, Saw SM, Gazzard G, Koh D, Widjaja D, et al. Prevalence and risk factors associated with dry eye symptoms: a population based study in Indonesia. *Br J Ophthalmol* 2002; 86 (12): 1347-51.

Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *Clao J* 1995; 21 (4): 221-32.

Lemp MA. Epidemiology and classification of dry eye. *Adv Exp Med Biol* 1998; 438: 791-803.

Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, et al. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93 (20): 11047-52.

Lin PY, Cheng CY, Hsu WM, Tsai SY, Lin MW, Liu JH, et al. Association between symptoms and signs of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan: the Shihpai Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46 (5): 1593-8.

Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, et al. Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest* 1998; 101 (6): 1219-24.

Lyons TJ, Silvestri G, Dunn JA, Dyer DG, Baynes JW. Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and nondiabetic senile cataracts. *Diabetes* 1991; 40 (8): 1010-5.

Maillard LC. Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie méthodique. *Comptes Rendus des Sciences de L'Academie des Sciences* 1912; 154: 66-68.

Makita Z, Vlassara H, Rayfield E, Cartwright K, Friedman E, Rodby R, et al. Hemoglobin-AGE: a circulating marker of advanced glycosylation. *Science* 1992; 258 (5082): 651-3.

Martin I, Grotewiel MS. Oxidative damage and age-related functional declines. *Mech Ageing Dev* 2006; 127 (5): 411-23.

Mathers WD, Lane JA, Zimmerman MB. Tear film changes associated with normal aging. *Cornea* 1996; 15 (3): 229-34.

Matsuse T, Ohga E, Teramoto S, Fukayama M, Nagai R, Horiuchi S, et al. Immunohistochemical localisation of advanced glycation end products in pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol* 1998; 51 (7): 515-9.

McCance DR, Dyer DG, Dunn JA, Bailie KE, Thorpe SR, Baynes JW, et al. Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993; 91 (6): 2470-8.

McCarty CA, Bansal AK, Livingston PM, Stanislavsky YL, Taylor HR. The epidemiology of dry eye in Melbourne, Australia. *Ophthalmology* 1998; 105 (6): 1114-9.

McFarland KF, Catalano EW, Day JF, Thorpe SR, Baynes JW. Nonenzymatic glycosylation of serum proteins in diabetes mellitus. *Diabetes* 1979; 28 (11): 1011-4.

McGill JJ, Liakos GM, Goulding N, Seal DV. Normal tear protein profiles and age-related changes. *Br J Ophthalmol* 1984; 68 (5): 316-20.

McNamara NA, Brand RJ, Polse KA, Bourne WM. Corneal function during normal and high serum glucose levels in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39 (1): 3-17.

Mercurio F, Manning AM. NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 1999; 18 (45): 6163-71.

Messier C. Impact of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes on cognitive aging. *Neurobiol Aging* 2005; 26 Suppl 1: 26-30.

Messier C, Teutenberg K. The role of insulin, insulin growth factor, and insulin-degrading enzyme in brain aging and Alzheimer's disease. *Neural Plast* 2005; 12 (4): 311-28.

Mitamura Y, Harada T, Harada C, Ohtsuka K, Kotake S, Ohno S, et al. NF-kappaB in epiretinal membranes after human diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2003; 46 (5): 699-703.

Miyata S, Monnier V. Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrraline. *J Clin Invest* 1992; 89 (4): 1102-12.

Moller DE, Flier JS. Insulin resistance--mechanisms, syndromes, and implications. *N Engl J Med* 1991; 325 (13): 938-48.

Monnier VM, Cerami A. Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science* 1981; 211 (4481): 491-3.

Moore TC, Moore JE, Kaji Y, Frizzell N, Usui T, Poulaki V, et al. The role of advanced glycation end products in retinal microvascular leukostasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44 (10): 4457-64.

Moss SE, Klein R, Klein BE. Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome. *Arch Ophthalmol* 2000; 118 (9): 1264-8.

Munch G, Schinzel R, Loske C, Wong A, Durany N, Li JJ, et al. Alzheimer's disease--synergistic effects of glucose deficit, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *J Neural Transm* 1998; 105 (4-5): 439-61.

Myers MG, Jr., White MF. Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36: 615-58.

Naka Y, Bucciarelli LG, Wendt T, Lee LK, Rong LL, Ramasamy R, et al. RAGE axis: Animal models and novel insights into the vascular complications of diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24 (8): 1342-9.

Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 328 (23): 1676-85.

Navia JM, Narkates AJ. Dental Research. In: Baker Hj, Lindsey Jr, Weisbroth Sh. The laboratory rat: research applications. Nova Iorque: Academic Press; 1980. p.59-74.

Nelson JD. Ocular surface impressions using cellulose acetate filter material. Ocular pemphigoid. *Surv Ophthalmol* 1982; 27 (1): 67-9.

Nepp J, Abela C, Polzer I, Derbolav A, Wedrich A. Is there a correlation between the severity of diabetic retinopathy and keratoconjunctivitis sicca? *Cornea* 2000; 19 (4): 487-91.

Ohashi Y, Motokura M, Kinoshita Y, Mano T, Watanabe H, Kinoshita S, et al. Presence of epidermal growth factor in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30 (8): 1879-82.

Okamoto M, Kahn CR, Maron R, White MF. Decreased autophosphorylation of EGF receptor in insulin-deficient diabetic rats. *Am J Physiol* 1988; 254 (4 Pt 1): E429-34.

Paliwal A, De PK. Marked sexual dimorphism of lacrimal gland peroxidase in hamster: repression by androgens and estrogens. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341 (4): 1286-93.

Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997; 349 (9057): 990-3.

Pflugfelder SC. Tear fluid influence on the ocular surface. *Adv Exp Med Biol* 1998; 438: 611-7.

Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A, Monroy D. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjogren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res* 1999; 19 (3): 201-11.

Pflugfelder SC, Solomon A, Stern ME. The diagnosis and management of dry eye: a twenty-five-year review. *Cornea* 2000; 19 (5): 644-9.

Pongor S, Ulrich PC, Bencsath FA, Cerami A. Aging of proteins: isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81 (9): 2684-8.

Portero-Otin M, Pamplona R, Bellmunt MJ, Ruiz MC, Prat J, Salvayre R, et al. Advanced glycation end product precursors impair epidermal growth factor receptor signaling. *Diabetes* 2002; 51 (5): 1535-42.

Pugliese G, Pricci F, Leto G, Amadio L, Iacobini C, Romeo G, et al. The diabetic milieu modulates the advanced glycation end product-receptor complex in the mesangium by inducing or upregulating galectin-3 expression. *Diabetes* 2000; 49 (7): 1249-57.

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

Rieger G. The importance of the precorneal tear film for the quality of optical imaging. *Br J Ophthalmol* 1992; 76 (3): 157-8.

Rocha EM, Carvalho CR, Saad MJ, Velloso LA. The influence of ageing on the insulin signalling system in rat lacrimal and salivary glands. *Acta Ophthalmol Scand* 2003; 81 (6): 639-45.

Rocha EM, Cunha DA, Carneiro EM, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Identification of insulin in the tear film and insulin receptor and IGF-1 receptor on the human ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43 (4): 963-7.

Rocha EM, de MLMH, Carvalho CR, Saad MJ, Velloso LA. Characterization of the insulin-signaling pathway in lacrimal and salivary glands of rats. *Curr Eye Res* 2000a; 21 (5): 833-42.

Rocha EM, Rocha FJ, Kara José Jr. N, Aguilar AJ. Olho Seco. In: Gomes Jap, Alves Mr. *Superfície Ocular*. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2006. p.57-68.

Rocha EM, Rocha FJ, Pena JDO. Olho Seco: Receptores Celulares e Terapia Farmacológica. In: Schor N, Boim Ma, Santos Op. *Clínica Médica: Medicina Celular e Molecular*. São Paulo: Sarvier; 2000b.

Rocha EM, Wickham LA, Huang Z, Toda I, Gao J, da Silveira LA, et al. Presence and testosterone influence on the levels of anti- and pro-inflammatory cytokines in lacrimal tissues of a mouse model of Sjogren's syndrome. *Adv Exp Med Biol* 1998; 438: 485-91.

Rong LL, Gooch C, Szabolcs M, Herold KC, Lalla E, Hays AP, et al. RAGE: a journey from the complications of diabetes to disorders of the nervous system - striking a fine balance between injury and repair. *Restor Neurol Neurosci* 2005; 23 (5-6): 355-65.

Saad MJ. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27 (4): 941-57.

Saad MJ, Maeda L, Brenelli SL, Carvalho CR, Paiva RS, Velloso LA. Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. *Diabetologia* 1997; 40 (2): 179-86.

Sady C, Khosrof S, Nagaraj R. Advanced Maillard reaction and crosslinking of corneal collagen in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 214 (3): 793-7.

Sasaoka T, Ishiki M, Sawa T, Ishihara H, Takata Y, Imamura T, et al. Comparison of the insulin and insulin-like growth factor 1 mitogenic intracellular signaling pathways. *Endocrinology* 1996; 137 (10): 4427-34.

Saxena P, Saxena AK, Cui XL, Obrenovich M, Gudipaty K, Monnier VM. Transition metal-catalyzed oxidation of ascorbate in human cataract extracts: possible role of advanced glycation end products. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41 (6): 1473-81.

Schaumberg DA, Buring JE, Sullivan DA, Dana MR. Hormone replacement therapy and dry eye syndrome. *Jama* 2001; 286 (17): 2114-9.

Schaumberg DA, Sullivan DA, Dana MR. Epidemiology of dry eye syndrome. *Adv Exp Med Biol* 2002; 506 (Pt B): 989-98.

Schein OD, Munoz B, Tielsch JM, Bandeen-Roche K, West S. Prevalence of dry eye among the elderly. *Am J Ophthalmol* 1997; 124 (6): 723-8.

Schnider SL, Kohn RR. Glucosylation of human collagen in aging and diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1980; 66 (5): 1179-81.

Schnider SL, Kohn RR. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glucosylation of human skin collagen. *J Clin Invest* 1981; 67 (6): 1630-5.

Seifart U, Stempel I. The dry eye and diabetes mellitus. *Ophthalmologie* 1994; 91 (2): 235-9.

Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Results of a population-based questionnaire on the symptoms and lifestyles associated with dry eye. *Cornea* 1999; 18 (4): 408-11.

Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. *J Biochem Mol Biol* 2002; 35 (1): 28-40.

Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001; 44 (2): 129-46.

Solomon A, Dursun D, Liu Z, Xie Y, Macri A, Pflugfelder SC. 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; 42 (10): 2283-92.

Stevens VJ, Rouzer CA, Monnier VM, Cerami A. Diabetic cataract formation: potential role of glycosylation of lens crystallins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75 (6): 2918-22.

Stitt AW. Advanced glycation: an important pathological event in diabetic and age related ocular disease. *Br J Ophthalmol* 2001; 85 (6): 746-53.

Stitt AW, He C, Friedman S, Scher L, Rossi P, Ong L, et al. Elevated AGE-modified ApoB in sera of euglycemic, normolipidemic patients with atherosclerosis: relationship to tissue AGEs. *Mol Med* 1997a; 3 (9): 617-27.

Stitt AW, Li YM, Gardiner TA, Bucala R, Archer DB, Vlassara H. Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am J Pathol* 1997b; 150 (2): 523-31.

Stoppiglia LF, Nogueira TA, Leite AR, Carneiro EM, Boschero AC. Protective effect of D-glucose, L-leucine and fetal calf serum against oxidative stress in neonatal pancreatic islets. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1588 (2): 113-8.

Sullivan DA. Sex hormones and Sjogren's syndrome. *J Rheumatol Suppl* 1997; 50: 17-32.



Sullivan DA, Hann LE. 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* 1989; 34 (1-6): 253-62.

Sullivan DA, Hann LE, Yee L, Allansmith MR. Age- and gender-related influence on the lacrimal gland and tears. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1990; 68 (2): 188-94.

Sullivan DA, Krenzer KL, Sullivan BD, Tolls DB, Toda I, Dana MR. Does androgen insufficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous tear deficiency? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40 (6): 1261-5.

Sullivan DA, Rocha EM, Ullman MD, Krenzer KL, Gao J, Toda I, et al. Androgen regulation of the meibomian gland. *Adv Exp Med Biol* 1998; 438: 327-31.

Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107 (1): 7-11.

Taylor SI. Deconstructing type 2 diabetes. *Cell* 1999; 97 (1): 9-12.

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

Tomita T, Takeuchi E, Tomita N, Morishita R, Kaneko M, Yamamoto K, et al. Suppressed severity of collagen-induced arthritis by in vivo transfection of nuclear factor kappaB decoy oligodeoxynucleotides as a gene therapy. *Arthritis Rheum* 1999; 42 (12): 2532-42.

Tseng SC, Tsubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol* 1997; 124 (6): 825-35.

Tsubota K, Nakamori K. Effects of ocular surface area and blink rate on tear dynamics. *Arch Ophthalmol* 1995; 113 (2): 155-8.

Ubels JL, Foley KM, Rismondo V. Retinol secretion by the lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27 (8): 1261-8.

Ulrich P, Zhang X. Pharmacological reversal of advanced glycation end-product-mediated protein crosslinking. *Diabetologia* 1997; 40 Suppl 2: S157-9.

Veras RP. Brazil is getting older: demographic changes and epidemiological challenges. *Rev Saude Publica* 1991; 25 (6): 476-88.

Verma IM. Nuclear factor (NF)-kappaB proteins: therapeutic targets. *Ann Rheum Dis* 2004; 63 Suppl 2: ii57-ii61.

Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation of peripheral nerve protein in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78 (8): 5190-2.

Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82 (17): 5588-92.

Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Specific macrophage receptor activity for advanced glycosylation end products inversely correlates with insulin levels in vivo. *Diabetes* 1988; 37 (4): 456-61.

Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 1994; 70 (2): 138-51.

Vlassara H, Fuh H, Makita Z, Krungkrai S, Cerami A, Bucala R. Exogenous advanced glycosylation end products induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89 (24): 12043-7.

Watanabe H. Significance of mucin on the ocular surface. *Cornea* 2002; 21 (2 Suppl 1): S17-22.

Weis RM, McConnell HM. Molecular basis of cell-cell recognition. *Prog Clin Biol Res* 1982; 102 pt A: 331-6.

White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem* 1994; 269 (1): 1-4.

Wilson SE. Lacrimal gland epidermal growth factor production and the ocular surface. *Am J Ophthalmol* 1991; 111 (6): 763-5.

Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001; 107 (2): 135-42.

Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, Schmidt AM. Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res* 2003; 93 (12): 1159-69.

Zarina S, Zhao HR, Abraham EC. Advanced glycation end products in human senile and diabetic cataractous lenses. *Mol Cell Biochem* 2000; 210 (1-2): 29-34.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414 (6865): 782-7.

Zoukhri D. Effect of inflammation on lacrimal gland function. *Exp Eye Res* 2006; 82 (5): 885-98.

Zoukhri D, Hodges RR, Byon D, Kublin CL. Role of proinflammatory cytokines in the impaired lacrimation associated with autoimmune xerophthalmia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43 (5): 1429-36.



***ANEXOS***

**Anexo 1** - Alves M, Calegari VC, Cunha DA, Saad MJA, Velloso LA, Rocha EM.  
Increased expression of Advanced Glycation End-products and their receptor,  
and activation of Nuclear Factor kappaB in lacrimal glands of diabetic rats.  
*Diabetologia* 2005;48:2675-81

*Diabetologia* (2005) 48: 2675–2681  
DOI 10.1007/s00125-005-0010-9

ARTICLE

M. Alves · V. C. Calegari · D. A. Cunha · M. J. A. Saad ·  
L. A. Velloso · E. M. Rocha

**Increased expression of advanced glycation end-products  
and their receptor, and activation of nuclear factor  
kappa-B in lacrimal glands of diabetic rats**

Received: 2 February 2005 / Accepted: 12 July 2005 / Published online: 8 November 2005  
© Springer-Verlag 2005

**Abstract** *Aims/hypothesis:* To assess the involvement of the AGE-specific receptor (AGER, also known as RAGE) axis and nuclear factor kappa-B (NFKB, also known as NF-kappaB) activation in the development of lacrimal gland and tear film dysfunction in diabetes, the present study evaluated: (1) lacrimal gland and tear film alterations in diabetic rats; and (2) the expression of AGE, AGER and NFKB in ocular tissues of normoglycaemic and diabetic rats. *Materials and Methods:* Diabetes was induced in male Wistar rats with intravenous streptozotocin. Tear secretion parameters were measured and NFKB expression was evaluated in lacrimal glands of control and diabetic rats by western blot. Immunohistochemistry with confocal microscopy was used to assess AGE, AGER and NFKB expression in lacrimal glands of both groups. *Results:* Lacrimal gland weight and tear film volume were lower in diabetic than in control rats ( $p=0.01$  and  $0.02$ , respectively). IL1B and TNF concentrations in tears were higher in diabetic than in control rats ( $p=0.007$  and  $0.02$ , respectively). NFKB protein was identified in rat cornea, conjunctiva and lacrimal glands. AGE, AGER and NFKB expression were greater in lacrimal glands of diabetic than in those of control rats. *Conclusions/interpretation:* Diabetes induces significant alterations in rat lacrimal gland structure and secre-

tion. The higher expression of AGE, AGER and NFKB in lacrimal glands of diabetic rats suggests that these factors are involved in signalling and in subsequent inflammatory alterations related to dry eye in diabetes mellitus.

**Keywords** Advanced glycated end-products · Diabetes · Dry eye · Lacrimal gland · Nuclear factor kappa-B

**Abbreviations** AGER: AGE-specific receptor · CEL: N<sup>ε</sup>-carboxyethyl-lysine · CML: N<sup>ε</sup>-carboxymethyl-lysine · NFKB1: nuclear factor kappa B 1

**Introduction**

Diabetes is associated with lacrimal gland and ocular surface dysfunctions related to dry eye syndrome [1–4]. Previous studies have suggested that chronic hyperglycaemia, corneal nerve alterations and disturbance in insulin action may play an important role in the development of such alterations, but the exact mechanisms that underlie these changes are not completely understood [5–8]. In accordance with the insulin action hypothesis, we have previously demonstrated that insulin receptor activation and other steps of insulin signalling pathways are impaired in lacrimal glands in animals with diabetes mellitus [9].

One of the major consequences of the hyperglycaemia and oxidative stress observed in diabetes is the formation of AGE as a result of the chemical reaction of carbohydrates with proteins. AGE binding to the AGE receptor (AGER, also known as RAGE), leads, among other events, to activation of the transcription factor nuclear factor kappa-B (NFKB1, also known as NF-kappaB), which has been proposed as a critical bridge between oxidant stress and gene expression [10].

NFKB1 is a heterodimer consisting of the subunits p50 and p65 complexed with the inhibitory subunit IκB. Its stimulation mechanism involves the degradation of the inhibitory subunit, IκB, freeing NFKB1 to translocate to the nucleus, where it regulates the expression of a large number of genes associated with cellular response to stress, such as tumour necrosis factor (TNF, also known as TNF-α),

M. Alves · V. C. Calegari · M. J. A. Saad · L. A. Velloso ·  
E. M. Rocha  
Laboratory of Clinical Physiopathology,  
Department of Clinical Medicine,  
School of Medicine,  
State University of Campinas (UNICAMP),  
Campinas, Brazil

D. A. Cunha  
Institute of Biology,  
State University of Campinas (UNICAMP),  
Campinas, Brazil

E. M. Rocha (✉)  
Departamento de Oftalmologia, FMRP,  
São Paulo University,  
Av. Bandeirantes, 3900,  
14049-900 Ribeirão Preto SP, Brazil  
e-mail: emrocha@fmrp.usp.br

interleukin-1 beta (IL1B) and AGER [10]. Therefore, upon rapid accumulation of AGE in diabetic tissues, the up-regulation and activation of AGER magnifies cellular perturbation in tissues affected by hyperglycaemia, leading to chronic complications in these tissues [10–13].

IL1B and TNF are known to influence the function of lacrimal gland tissues [14]. In addition, *Il1b* and *Tnf* mRNA are increased in lacrimal gland and salivary glands of animal models with exocrine gland inflammatory dysfunction and on the ocular surface of patients with dry eye syndrome [15, 16]. AGE-related mechanisms have been found to play a role in the pathogenesis of ocular diseases such as diabetic vitreous-retinopathy [17–19], age-related macular degeneration [20, 21] and cataract [22–24]. Taken together, these data suggest that the possible mechanisms by which hyperglycaemia and oxidative stress act in diabetes-related lacrimal gland dysfunction may involve the formation of AGE and activation of NFKB1 in the lacrimal gland, leading to the expression of pro-inflammatory cytokines such as IL1B and TNF in this tissue.

Streptozotocin has been used for decades to induce diabetes in animal models. However, the lacrimal gland and ocular surface alterations that are related to diabetes have not been completely characterised in this model [9, 25, 26].

Therefore, the objectives of the present study were: (1) to characterise diabetes-related alterations in lacrimal glands and tears of streptozotocin-induced diabetic rats; (2) to determine whether lacrimal gland and ocular surface tissues express NFKB1, AGE and AGER; and (3) to evaluate the influence of diabetes on the expression of AGE, AGER and NFKB1 in the lacrimal gland.

## Materials and methods

### Animal model

Eight-week-old male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were obtained from the State University of Campinas Animal Breeding Centre, Campinas, São Paulo, Brazil. Animals were given free access to standard rodent chow and water. Food was withdrawn 12 h before the experiments and diabetes was induced with a single dose of streptozotocin (Sigma, St Louis, MO, USA), 60 mg/kg body weight, diluted in 1 ml citrate buffer 0.01 mol/l administered through the caudal vein. Controls were injected with citrate buffer alone. Comparative studies of the two groups were performed 10 weeks after diabetes induction.

All experimental procedures adhered to the “Principles of laboratory animal care” (NIH publication no. 85-23), and were approved by the University’s committee on animal experimentation.

### Serum glucose determination

Four weeks after treatment, rats were anaesthetised with an intraperitoneal injection of sodium thiopental, 50 mg/kg (Cristália, Itapira, SP, Brazil), and blood samples were col-

lected from streptozotocin-treated and control animals ( $n=15$  per group) by puncture of a caudal vein 10 to 15 min later, as soon as anaesthesia was assured by the loss of foot and corneal reflexes. Samples were analysed by the colorimetric oxidase glucose method (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil), and absorbance values, determined by spectrophotometry (U-2000 spectrophotometer; Hitachi, Japan), were compared to a known glucose concentration curve.

### Determination of tear volume and IL1B and TNF content in the tear film

Tear volume was measured in both study groups ( $n=10$  per group) 10 weeks after streptozotocin treatment. Under the same anaesthetic conditions, tears were collected with the use of micropipettes (Eppendorf Research, Hamburg, Germany) from the lacrimal meniscus, while trying to collect the whole tear volume in one take and also to avoid stimuli.

IL1B and TNF were measured in tears ( $n=5$  per group) from diabetic and control rats using an ELISA kit for IL1B and TNF (Pierce Endogen, Rockford, IL, USA), according to manufacturer’s instructions.

### Assay of peroxidase activity in lacrimal gland

Peroxidase activity in lacrimal gland of diabetic and control rats ( $n=5$  per group) was determined 10 weeks after streptozotocin injection. As previously described, peroxidase is a marker enzyme well suited for the study of protein export in the lacrimal gland system [27]. Lacrimal gland samples were homogenised in Hanks’ solution at 4°C and centrifuged at 10,000×g for 8 min. The protein concentration of the supernatant was measured by the biuret dye method (Labtest), to obtain a standard concentration of 100 µg/ml protein in each sample. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added at a final concentration of 2.3 mmol/l to each experimental and control sample. Aliquots were collected at 0, 5, 10, 20, 30, 40 and 60 min and peroxidase activity was measured using a colorimetric reaction (Glucose GODPAP; Laborlab, Guarulhos, SP, Brazil) and compared to a standard H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> curve. Values were fitted with single exponential decay curves according to the formula:  $[H_2O_2]_t = [H_2O_2]_{t=0} \times e^{-kt}$ , where the peroxidase activity of each sample is represented by the  $k$  value (decay constant) or the rate of decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration per minute obtained [28].

### Evaluation of the expression of NFKB1 on the ocular surface and in lacrimal gland

Western blot studies to evaluate the expression of NFKB1 using rabbit polyclonal anti-NFKB1 subunit p65 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) were performed on whole-cell lysates from cornea, conjunctiva and lacrimal gland obtained from 8-week-old rats, as well as in nuclear and cytoplasmic extracts of both study groups as previously described [9]. In summary, samples were

homogenised and protein quantification was performed as mentioned above after centrifugation. Samples were treated with Laemmli buffer, and equal amounts of protein per sample (ranging from 33 to 300 µg) were subjected to SDS-PAGE (10% Tris-acrylamide) in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus (Miniprotean; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), in parallel with pre-stained protein standards and β-mercaptoethanol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proteins were then electro-transferred from the gel to an ECL nitrocellulose membrane (Hybond; Amersham, Buckinghamshire, UK) for 2 h at 120 V in a miniature transfer apparatus (Bio-Rad). After blocking, the membranes were incubated overnight with rabbit polyclonal anti-NFKB1 subunit p65 (Santa Cruz) at a concentration of 0.4 µg/µl in a buffer with 3% BSA, and then washed three times as described above. The blots were then incubated with <sup>125</sup>I-labelled protein A (Amersham) and detected by autoradiography.

#### Determination of the expression of NFKB1 in nuclear and cytoplasmic extracts of lacrimal gland

Nuclear and cytoplasmic extracts were obtained from the exorbital lacrimal gland of diabetic and control rats (*n*=5 per group) collected under thiopental anaesthesia 5 and 10 weeks after the induction of diabetes, as previously described [29]. In summary, lacrimal gland homogenates were centrifuged at 2,000×*g* for 10 min at 4°C in a centrifuge (5804R; Eppendorf). The pellet was then resuspended in buffer A, and centrifuged again at the same speed and for the same time. The supernatant corresponded to the cytoplasmic extract. The pellet was then resuspended in a buffer B containing 420 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 20 mmol/l HEPES, pH 7.9, 20% glycerol, 1 mmol/l DTT, 1 mmol/l Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma), and 0.8 mg aprotinin. The resuspended material was then sonicated 10 times in a homogeniser (Potter-Elvehjem; Kimble Kontes, Vineland, NJ, USA) for 30 min, and then centrifuged at 16,000×*g* for 30 min. The supernatant corresponded to the nuclear extract. Again, protein quantification was performed and equal amounts of protein (150 µg) were used for each sample in the western blot studies with anti-NFKB1 subunit p65 (Santa Cruz).

Images of developed autoradiographs were scanned, and band intensities were quantified by optical densitometry using image analysis software (Scion Image Analysis Software, Scion, Frederick, MD, USA).

#### Expression and immunochemical localisation of NFKB1, AGE and AGER in the lacrimal gland and cornea of diabetic and control rats

The expression of NFKB1, AGE and AGER was evaluated in lacrimal gland and cornea of diabetic and control rats (*n*=5 per group) using immunohistochemistry and confocal mi-

croscopy. Lacrimal gland and cornea were excised, some of them were embedded in OCT compound (Sakura Fine Tek, Torrance, CA, USA), frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C, while others were fixed in buffered formalin (10%) and immersed in paraffin. Tissue specimens were cut into 6 µm sections at -20°C and transferred to poly-L-lysine pre-coated glass slides (Perfecta, São Paulo, SP, Brazil). Slides of paraffin sections were submitted to haematoxylin-eosin staining.

The slides used for immunohistochemistry were exposed to acetone for 10 min, washed in PBS (0.1 mol/l sodium phosphate, 0.15 mol/l sodium chloride, pH 7.4) and exposed to 3% BSA (Sigma) solution for 1 h at 22°C to reduce non-specific protein binding. The sections were incubated overnight with the following primary antibodies: anti-NFKB1 rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnologies) specific for the p65 subunit, anti-AGE mouse monoclonal antibody 6D12 specific for N<sup>ε</sup>-carboxymethyl-lysine (CML) and N<sup>ε</sup>-carboxyethyl-lysine (CEL) [30] (Research Diagnostics, Flanders, NJ, USA), or anti-AGER rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz), at a concentration of 4 µg/µl with 1% BSA in PBS. The sections were then washed in PBS and incubated for 2 h with an anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) at a concentration of 375 µg/µl in a 1% BSA solution. Sections were then washed and counterstained with phalloidin (Sigma) concentrated to 0.1 µg/µl for 45 min in a dark chamber. The slides were covered with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and a cover slip. Controls for immunospecificity were included in all experiments by omitting the primary antibody and replacing it with PBS and matching concentrations of normal rabbit or mouse serum. Photographic documentation was performed using a confocal microscope (Axiovert 200 M; Zeiss, Wetzlar, Germany) and the same exposure parameters for diabetic and control samples. Image analysis was done with LSM 510 V 3.2 software (Zeiss).

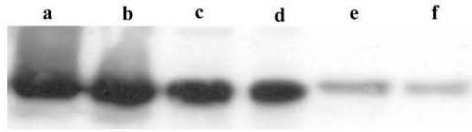
#### Statistical analysis

Data are expressed as means±SEM. Comparisons were made using the Mann-Whitney *U*-test (Statview; Abacus, Berkeley, CA USA). Densitometric values are expressed as a percentage of the mean value obtained for the control group, which was defined as 100% in each experimental assay. The level of significance used was *p*<0.05.

## Results

#### Characterisation of lacrimal gland changes in streptozotocin-induced diabetic rats

Four weeks after streptozotocin treatment, rats were markedly hyperglycaemic compared to citrate buffer-treated con-



**Fig. 1** NFKB1 p65 expression in lacrimal gland (LG), cornea (CO) and conjunctiva (CJ) of 8-week-old Wistar rats. The findings are representative of three independent experiments with three animals each. Tissues were collected and whole cell lysates analysed by western blot. Molecular weight markers were run in parallel. Lane a: LG 300 µg of loaded protein; lane b: LG 150 µg of protein; lane c: CO 200 µg of protein; lane d: CO 100 µg of protein; lane e: CJ 66 µg of protein; lane f: CJ 33 µg of protein

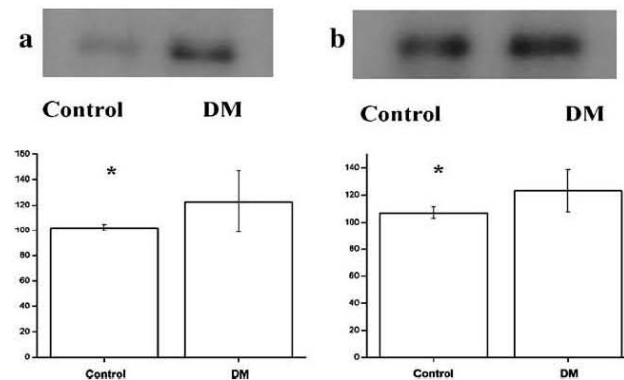
controls, with the two groups presenting serum glucose of  $31.9 \pm 5.4$  and  $9.6 \pm 1.1$  mmol/L, respectively ( $n=15$  per group). Mean body weight was  $256.00 \pm 8.62$  g in diabetic rats and  $349.00 \pm 7.79$  g in controls ( $n=5$  per group) ( $p=0.01$ ).

In order to characterise the alterations induced by diabetes in lacrimal gland and tears, the studies described below were performed.

Mean lacrimal gland weight was  $70 \pm 20$  mg in diabetic rats and  $130 \pm 10$  mg in controls ( $n=5$  per group) ( $p=0.01$ ), and the lacrimal gland weight : body weight ratio was  $0.26 \pm 0.03$  mg/g in diabetic rats and  $0.38 \pm 0.03$  mg/g in controls ( $p=0.02$ ). Ten weeks after streptozotocin treatment, the tear volume was  $0.97 \pm 0.62$  µl in diabetic rats and  $1.64 \pm 0.93$  µl in control rats ( $n=10$  per group) ( $p=0.02$ ).

Peroxidase levels were slightly higher in lacrimal gland of diabetic rats, as demonstrated by the peroxidase activity decay determined at the same time-point in samples of both groups. This finding, however, did not achieve significance. The decay of  $H_2O_2$  over 1 h was  $138 \pm 46$  µmol/l min in diabetic rats and  $69 \pm 23$  µmol/l min in control rats ( $n=5$  per group) ( $p=0.34$ ).

**Fig. 2** Effect of streptozotocin-induced diabetes on NFKB1 p65 expression in nuclear (a) and cytoplasmic (b) extracts of lacrimal gland. Ten weeks after streptozotocin injection, lacrimal glands were excised and nuclear and cytoplasmic extracts ( $n=3$  animals per group) were analysed by western blot using an anti-NFKB1 antibody specific for the p65 subunit. Values are represented as means  $\pm$  SEM. Values for the control group were defined as 100%, and those for diabetic animals are expressed as a percentage of this. Results are representative of three independent experiments. Higher expression of NFKB1 p65 was detected in nuclear and cytoplasmic extracts of diabetic animals ( $p=0.02$ )



#### Determination of IL1B and TNF in tears

The inflammatory aspects of diabetes in tears were evaluated by comparing pro-inflammatory cytokines in both groups. In tears collected 10 weeks after streptozotocin treatment IL1B values were  $10.12 \pm 1.24$  ng/ml in diabetic versus  $4.26 \pm 0.18$  ng/ml in control rats ( $p=0.007$ ). The values for TNF were:  $160.92 \pm 35.89$  pg/ml in diabetic rats and  $57.32 \pm 12.68$  pg/ml in control rats ( $p=0.02$ ).

#### NFKB1 expression in control and diabetic lacrimal gland and ocular surface tissues

Western blot analysis was performed to confirm the presence of NFKB1 in lacrimal gland and on the ocular surface, and to compare its expression in lacrimal gland of diabetic versus control rats.

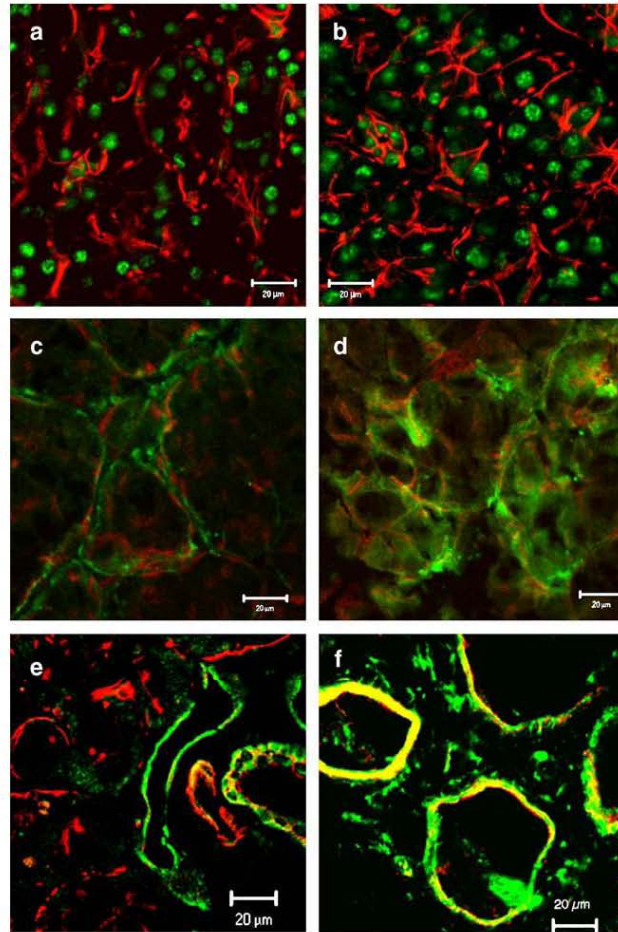
Expression of NFKB1 proteins was detected in the cornea, conjunctiva and lacrimal gland of 8-week-old control rats (Fig. 1). The comparative expression of NFKB1 in nuclear and cytoplasmic extracts of lacrimal gland control and diabetic rats 5 weeks after streptozotocin injection was similar ( $p=0.99$  for both extracts; data not shown). Ten weeks after streptozotocin injection, NFKB1 protein was expressed in higher levels in nucleus and cytoplasmic extracts of diabetic animals than in those from control animals ( $n=3$  per group) ( $p=0.02$  and  $p=0.02$ , respectively). These results were confirmed in three independent experiments (Fig. 2a,b).

#### Histological evaluation and immunochemical localisation of NFKB, AGE and AGER in lacrimal gland

Histological comparison between diabetic and control lacrimal gland revealed a similar distribution of epithelial and connective tissue, as well as similar acini size and dis-

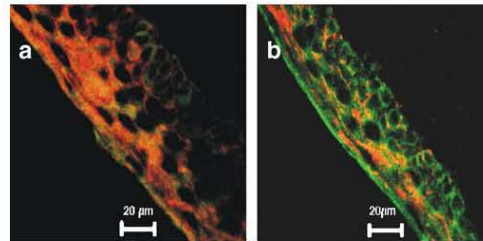


**Fig. 3** Representative immunohistochemical confocal microphotographs of lacrimal glands from control and diabetic rats. *Green staining:* (a, b) NF $\kappa$ B1 p65 in control rats and diabetic rats respectively; (c, d) AGE antibody 6D12 specific for N $^{\epsilon}$ -carboxymethyl lysine (CML) and N $^{\epsilon}$ -carboxyethyl-lysine (CEL) in control and diabetic rats respectively; (e, f) AGER in control and diabetic rats. *Red:* slides were counterstained with phalloidin, indicating the localisation of actin in the acinar or ductal cell membrane. Micrographs are representative of two independent experiments with five animals per group. Exposure parameters were constant throughout the experiments. *Bar:* 20  $\mu$ m



tribution and absence of lymphocyte infiltration (data not shown).

Immunohistochemistry studies demonstrated cytoplasmic and nuclear NF $\kappa$ B1 expression in acinar cells of lacrimal gland, with higher levels of expression in nuclear and cytoplasmic extracts from diabetic animals than in those from controls (Fig. 3a,b). In addition, AGE expression was observed in samples of rat lacrimal gland tissue, with more intense staining in the basal membrane and connective tissue of diabetic rats (Fig. 3c,d). AGER protein was also identified in lacrimal gland, predominantly in ductal cells, and was more intensely expressed in diabetic than in control rats (Fig. 3e,f). AGER expression was also detected in corneal epithelial cells, mainly located in the cell mem-



**Fig. 4** Representative immunohistochemical confocal microphotographs demonstrating AGER staining (*green*) in the cornea of control (a) and diabetic (b) rats. Slides were counterstained with phalloidin (*red*) indicating the localisation of actin in the epithelial membrane. Selected micrographs are representative of two independent experiments with five animals per group. Exposure parameters were constant throughout the experiments

brane and cytoplasm; it was more intensely expressed in diabetic than in control rats (Fig. 4a,b).

## Discussion

Ocular surface complications associated with diabetes include dry eye symptoms [1–5]. However, the cascade of events that lead to alterations of tear film and lacrimal gland function in diabetes is not completely understood. Various recent reports have described increased AGE accumulation, AGER expression and NF $\kappa$ B1 activation in the organs of diabetic animals, and have postulated the pathophysiological relevance of these cellular events in diabetic complications such as diabetic retinopathy [10, 13]. Here we studied whether the AGE–AGER axis contributes to lacrimal gland and tear film disease in a streptozotocin-induced diabetes animal model.

Using this model, we first demonstrated alterations that indicated the presence of lacrimal gland and ocular film dysfunction in diabetic rats, such as a significantly lower tear volume and a significantly lower lacrimal gland weight: body weight ratio in diabetic rats compared to controls. These changes are analogous to those described in similar animal models, and in humans suffering from dry eye syndrome [1–3, 16, 31].

Peroxidase activity was slightly higher in diabetic lacrimal gland. This finding was surprising and different from that observed in ageing models [32]. However, two different recent works observed that streptozotocin-induced diabetes [33] and androgen or thyroid hormone suppression [34] in fact lead to higher peroxidase activity in lacrimal glands than that seen in controls with intact hormone function.

Next, we demonstrated that NF $\kappa$ B1 p65 is expressed in lacrimal gland and ocular tissues of control rats and, more importantly, that this expression is significantly increased in nuclear and cytoplasmic lacrimal gland extracts from diabetic animals compared to controls. These results were confirmed in western blot and immunohistochemistry studies and were in accordance with our initial hypothesis of an involvement of NF $\kappa$ B1 in the lacrimal gland dysfunction observed in diabetes.

To further explore this hypothesis, we then studied the expression of AGE and AGER, two mediators of the cellular events that lead to the activation of NF $\kappa$ B1, in lacrimal gland of diabetic and control rats. In fact, AGE and AGER expression were increased in lacrimal glands of diabetic compared to control rats, which suggests a relationship between the AGE–AGER axis, which involves the expression of NF $\kappa$ B1, and the lacrimal gland dysfunction observed in diabetic animals. As recently reported, the antibody used (6D12) in the present study recognises two antigenic structures of AGE: CML and CEL, both previously identified in ageing and diabetes-related diseases [30].

We observed an increase in NF $\kappa$ B1 not only in the nucleus, but also in the cytoplasm of lacrimal gland. As previously demonstrated, the higher levels in the cyto-

plasm, within the context of sustained activation of NF $\kappa$ B1 as seen in diabetes, imply a higher *de novo* synthesis of this transcription factor [11]. Furthermore, the occurrence of new NF $\kappa$ B1 synthesis and its higher presence in the nucleus without the inhibitory subunit I $\kappa$ B suggest that AGE/AGER interaction leads to NF $\kappa$ B1 activation, sustained oxidative stress and pro-inflammatory cytokine transcription, thus mediating tissue damage and impaired lacrimal gland function, as previously attributed to IL1B in autoimmune xerophthalmia [14].

It is also possible that S100/calgranulin, a pro-inflammatory ligand of AGER that is involved in pathological findings in other tissues of diabetes mellitus, plays a role in lacrimal gland alterations, but further investigation is needed on this. [35].

The marked staining for AGER in ductal epithelial cells, which was greater than in other lacrimal gland cells, was surprising and is not clearly understood. Moreover, despite its previous description in a range of other cells [23], it was not possible in the present work, using standard techniques like western blot, to achieve the same comparative intensity in control and diabetic lacrimal gland as was achieved in that study.

Taken together, the alterations in lacrimal gland and tear film observed by us in an animal model of diabetes allow us to postulate that the pathogenesis of ocular surface dysfunction, and specifically of the dry eye syndrome observed in diabetes mellitus, may be associated in part with the accumulation of AGE and activation of NF $\kappa$ B1 induced by chronic hyperglycaemia, an association that has been previously demonstrated in other ocular tissues [17–19, 31].

Due to the *in vivo* model adopted and the magnitude of the molecular differences observed, it is difficult to predict the weight of these events comparative to other changes observed in chronic diabetes, such as osmotic fluid changes and vascular and neurotrophic input reduction in the mechanism of lacrimal gland dysfunction in diabetes.

Previous studies with animal models have indicated a protective effect of pyridoxamine or aminoguanidine, two anti-AGE agents, against renal disease [36] and retinopathy [37] in the context of chronic hyperglycaemia and AGE accumulation. In addition, a clinical study indicated that antioxidant therapy can improve some parameters on the ocular surface of diabetic patients [38]. However, it remains to be clarified whether symptoms associated with the lacrimal gland and/or tear film dysfunction observed in diabetic patients could be improved or reversed by anti-AGE strategies. Future studies addressing these issues could lead to specific therapies for tear film and ocular surface alterations in diabetes.

**Acknowledgements** Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Foundation to Support Research of São Paulo State) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, National Council of Scientific and Technological Development).

## References

1. Ramos-Remus C, Suarez-Almazor M, Russell AS (1994) Low tear production in patients with diabetes mellitus is not due to Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 12:375-380
2. Seifart U, Stempel I (1994) The dry eye and diabetes mellitus. *Ophthalmologie* 91:235-239
3. Goebbels M (2000) Tear secretion and tear film function in insulin dependent diabetics. *Br J Ophthalmol* 84:19-21
4. Dogru M, Katakami C, Inoue M (2001) Tear function and ocular surface changes in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Ophthalmology* 108:586-592
5. Hyndiuk RA, Kazarian EL, Schultz RO, Seideman S (1977) Neurotrophic corneal ulcers in diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol* 95:2193-2196
6. Ishida N, Rao GN, del Cerro M, Aquavella JV (1984) Corneal nerve alterations in diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol* 102:1380-1384
7. Azar DT, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Gipson IK (1992) Altered epithelial-basement membrane interactions in diabetic corneas. *Arch Ophthalmol* 110:537-540
8. McNamara NA, Brand RJ, Polse KA, Bourne WM (1998) Corneal function during normal and high serum glucose levels in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:3-17
9. Rocha EM, de MLMH, Carvalho CR et al (2000) Characterization of the insulin-signaling pathway in lacrimal and salivary glands of rats. *Curr Eye Res* 21:833-842
10. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44:129-146
11. Bierhaus A, Schiekofler S, Schwaninger M et al (2001) Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 50:2792-2808
12. Portero-Otin M, Pamplona R, Bellmunt MJ et al (2002) Advanced glycation end product precursors impair epidermal growth factor receptor signaling. *Diabetes* 51:1535-1542
13. Vlassara H, Bucala R, Striker L (1994) Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 70:138-151
14. Zoukhri D, Hodges RR, Byon D, Kublin CL (2002) Role of proinflammatory cytokines in the impaired lacrimation associated with autoimmune xerophthalmia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:1429-1436
15. Rocha EM, Wickham LA, Huang Z et al (1998) Presence and testosterone influence on the levels of anti- and pro-inflammatory cytokines in lacrimal tissues of a mouse model of Sjogren's syndrome. *Adv Exp Med Biol* 438:485-491
16. Solomon A, Dursun D, Liu Z et al (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* 42:2283-2292
17. Stitt AW, Moore JE, Sharkey JA et al (1998) Advanced glycation end products in vitreous: structural and functional implications for diabetic vitreopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2517-2523
18. Kalfã TA, Gerritsen ME, Carlson EC et al (1995) Altered proliferation of retinal microvascular cells on glycosylated matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:2358-2367
19. Moore TC, Moore JE, Kaji Y et al (2003) The role of advanced glycation end products in retinal microvascular leukostasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4457-4464
20. Howes KA, Liu Y, Dunaief JL et al (2004) Receptor for advanced glycation end products and age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:3713-3720
21. Hammes HP, Hoerauf H, Alt A et al (1999) N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine and the AGE receptor RAGE colocalize in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:1855-1859
22. Ahmed N, Thornalley PJ, Dawczynski J et al (2003) Methylglyoxal-derived hydroimidazolone advanced glycation end-products of human lens proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:5287-5292
23. Das BK, Sun TX, Akhtar NJ et al (1998) Fluorescence and immunochemical studies of advanced glycation-related lens pigments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2058-2066
24. Saxena P, Saxena AK, Cui XL et al (2000) Transition metal-catalyzed oxidation of ascorbate in human cataract extracts: possible role of advanced glycation end products. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1473-1481
25. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV (1963) Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep* 29:91-98
26. Junod A, Lambert AE, Orzi L et al (1967) Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 126:201-205
27. Herzog V, Sies H, Miller F (1976) Exocytosis in secretory cells of rat lacrimal gland. Peroxidase release from lobules and isolated cells upon cholinergic stimulation. *J Cell Biol* 70:692-706
28. Stoppiglia LF, Nogueira TA, Leite AR et al (2002) Protective effect of D-glucose, L-leucine and fetal calf serum against oxidative stress in neonatal pancreatic islets. *Biochim Biophys Acta* 1588:113-118
29. Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM et al (1996) Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and *ob/ob* mice but not *db/db* mice. *Nat Genet* 14:95-97
30. Koito W, Araki T, Horiuchi S, Nagai R (2004) Conventional antibody against N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine (CML) shows cross-reaction to N(epsilon)-(carboxyethyl)lysine (CEL): immunochemical quantification of CML with a specific antibody. *J Biochem (Tokyo)* 136:831-837
31. Kaji Y, Usui T, Oshika T et al (2000) Advanced glycation end products in diabetic corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:362-368
32. Bromberg BB, Welch MH (1985) Lacrimal protein secretion: comparison of young and old rats. *Exp Eye Res* 40:313-320
33. Adegate E, Ponery A, Hameed R (2005) Notes on the effect of diabetes mellitus on the morphology and function of the rat lacrimal gland. *The Ocular Surface* 3: S42 [Abstract]
34. Paliwal A, Srikantan AQ, Stephano PK (2005) Androgen, estrogen and thyroid hormones repress tear peroxidase gene in lacrimal gland of hamster. *The Ocular Surface* 3:S102 [Abstract]
35. Hofmann MA, Drury S, Fu C et al (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97:889-901
36. Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD et al (2002) Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int* 61:939-950
37. Kern TS, Tang J, Mizutani M et al (2000) Response of capillary cell death to aminoguanidine predicts the development of retinopathy: comparison of diabetes and galactosemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3972-3978
38. Peponis V, Papathanasiou M, Kapranou A et al (2002) Protective role of oral antioxidant supplementation in ocular surface of diabetic patients. *Br J Ophthalmol* 86:1369-1373

## Nuclear factor- $\kappa$ B and advanced glycation end-products expression in lacrimal glands of aging rats

M Alves<sup>1</sup>, D Andrade Cunha<sup>2</sup>, V Cristine Calegari<sup>1</sup>, M J A Saad<sup>1</sup>,  
A Carlos Boschero<sup>2</sup>, L Augusto Velloso<sup>1</sup> and E Melani Rocha<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Clinical Physiopathology, Department of Clinical Medicine, School of Medicine, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

<sup>2</sup>Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

<sup>3</sup>Department of Ophthalmology, São Paulo University, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

(Requests for offprints should be addressed to E M Rocha, Departamento de Oftalmologia, FMRP, Universidade de São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil; Email: emrocha@fmrp.usp.br)

### Abstract

Advanced glycation end products (AGEs) increase with aging and induce signaling alterations that lead to inflammation and dysfunction in several tissues. Aging reduces function and insulin signaling in lacrimal glands (LGs). To evaluate whether AGE signaling and insulin secretion in LGs are altered in aging, 24- and 2-month-old male Wistar rats were compared. Immunohistochemistry with confocal microscopy was used to evaluate AGE, AGE receptor (RAGE) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) expression in LGs. Basal tear secretion volume, insulin, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels in tears and LGs and peroxidase activity in LG tissue were measured. Insulin secretion from isolated LGs and pancreatic  $\beta$ -cells was compared in the supernatant of aging and control rats *in vitro* by RIA after stimulation with 2.8–16.7 mM glucose, carbachol and

KCl. AGE, RAGE and NF- $\kappa$ B expression was higher in LGs of aging compared with young rats. Basal tear secretion and peroxidase activity were significantly lower in the aging group ( $P=0.016$  for both assays). IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels were higher in tears of aging rats compared with young rats ( $P=0.007$  and  $0.05$  respectively); however, even though aging rats were insulin-resistant (as confirmed by the insulin-tolerance test), the insulin levels in the tear film of aging and control rats were similar *in vivo* and *in vitro*. The higher expression of AGEs, RAGE and NF- $\kappa$ B in LGs of aging rats is accompanied by systemic insulin resistance and may be involved in LG and tear film alterations but does not affect insulin secretion in the tear film. These observations indicate that metabolic events may be related to LG and tear film dysfunctions in aging.

*Journal of Endocrinology* (2005) **187**, 159–167

### Introduction

It has been demonstrated that the process of aging is accompanied by morphological and secretory changes in lacrimal glands (LGs) that correlate with manifestations of dry eye (McGill *et al.* 1984, Bromberg & Welch 1985, Mathers *et al.* 1996, Schein *et al.* 1997, Draper *et al.* 1999, 2003). Among the pathophysiological mechanisms that underlie these changes, two possible events are the impairment of the mechanisms of insulin signal transduction (Carvalho *et al.* 1996, Rocha *et al.* 2003) and the formation of advanced glycation end products (AGEs), as also observed in other tissues (Vlassara *et al.* 1994, Stitt 2001). Taken together, these two hypotheses may predict that metabolic events, like insulin resistance, induce AGE accumulation in aging tissues and signaling alterations, leading to dysfunction in the secretory mechanisms of LGs.

Metabolic alterations involving early elements of the signaling cascades may be related to insulin reduction or

resistance and consequent organ dysfunctions in old rats (Castro *et al.* 1993, Perfetti *et al.* 1995, Paez-Espinosa *et al.* 1999, Rocha *et al.* 2004). One of the major consequences of insulin resistance, as observed in the elderly, is chronic hyperglycemia and oxidative stress leading to the formation of AGEs, obtained from chemical reaction of carbohydrates with proteins (Pongor *et al.* 1984, Singh *et al.* 2001, Evans *et al.* 2002). Previous studies have shown that AGEs alter the structure and functions of proteins, including those involved in cell signaling, and contribute to the chronic complications of aging (Vlassara *et al.* 1994, Zarina *et al.* 2000, Stitt 2001, Portero-Otin *et al.* 2002).

AGE binding to its receptor (RAGE) leads to the activation of the transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), which allows its translocation to the nucleus, where it regulates the expression of a large number of genes, including tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and RAGE (Singh *et al.* 2001, Evans *et al.* 2002). IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNAs are

expressed in LGs of animal models with exocrine gland inflammatory dysfunction and on the ocular surface of patients with dry eye syndrome, supporting the possible involvement of such cytokines in LG dysfunction in aging (Rocha *et al.* 1998, Solomon *et al.* 2001). In addition, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are known to influence the function of LG tissues (Zoukhri *et al.* 2002). Therefore, the mechanisms by which hyperglycemia and oxidative stress act in age-related LG dysfunction might involve the formation of AGEs and activation of NF- $\kappa$ B in the LGs, interfering with the signaling pathways and intracellular activity of cytokines such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ .

Insulin is a powerful inotropic element for LGs in culture (Hann *et al.* 1991). It is present in the tear film, and insulin receptors (IRs) have been demonstrated in LGs (Hann *et al.* 1991, Rocha *et al.* 2000). In rats, insulin secretion from pancreatic islet cells (Castro *et al.* 1993, Perfetti *et al.* 1995) and the secretory response of LGs are impaired by aging (Draper *et al.* 2003). It is unknown whether insulin secretion is reduced in aging LGs following the secretory dysfunctions observed in these tissues.

In order to assess the involvement of insulin and AGE-related metabolic pathways in the pathogenesis of LG dysfunction in the elderly, the objectives of the present study were to identify the effects of aging on (i) LG expression of NF- $\kappa$ B, AGEs and RAGEs, (ii) LG and tear content of the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ , and (3) LG patterns of insulin secretion.

## Material and Methods

### Animal model

Male Wistar rats aged 2 months (young) and 24 months (aging) provided by the university's (UNICAMP) Animal Breeding Center received standard rodent chow and water *ad libitum*. Food was withdrawn 12–14 h before the experiments. All experimental procedures adhered to the *UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals* and FRAME's guidelines and were approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas (UNICAMP).

### Immunohistochemistry

Exorbital lacrimal glands were excised from young and aging rats, embedded in Tissue Tek OCT (optimal cutting temperature) compound (Sakura Fine Tek, Torrance, CA, USA), frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Tissue specimens were cut using a cryostat into 7  $\mu\text{m}$  sections at  $-20^{\circ}\text{C}$  and transferred to poly-L-lysine pre-coated glass slides (Perfecta, São Paulo, SP, Brazil). The slides were exposed to acetone for 10 min, washed in PBS (0.1 M sodium phosphate and 0.15 M NaCl, pH 7.4; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) and exposed to

3% BSA solution (Sigma) for 1 h at  $22^{\circ}\text{C}$  to reduce nonspecific protein binding. The sections were overlaid with rabbit polyclonal anti-NF- $\kappa$ B subunit p65 antibody (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), anti-AGE mouse monoclonal antibody (Research Diagnostic, Flanders, NJ, USA) or anti-RAGE rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnologies) at 4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  concentration with 1% BSA in PBS. Following overnight incubation with primary antibody in a humidified chamber, the sections were washed in PBS and incubated for 2 h with anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) at a concentration of 375  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in 1% BSA. After incubation with the secondary antibody, sections were again washed and counterstained with phalloidin (Sigma) concentrated to 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  for 45 min in a dark chamber. The slides were covered with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and a coverslip. Photographic documentation was performed using a confocal Zeiss Axiovert 200 M microscope (Zeiss, Wetzlar, Germany).

### Determination of the expression of NF- $\kappa$ B in nuclear and cytoplasmic extracts of LGs

Western blot studies to evaluate the expression of NF- $\kappa$ B were performed on nuclear and cytoplasmic extracts of both study groups as described previously (Vaise *et al.* 1996, Rocha *et al.* 2000). In summary, nuclear and cytoplasmic extracts were obtained from the exorbital LGs of young and aging rats ( $n=6/\text{group}$  per experiment), collected under thiopental anaesthesia, and the tissues were coarsely minced and homogenized. The homogenate was centrifuged at 2000  $g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$  in an Eppendorf centrifuge 5804R, and the pellet was washed and resuspended in buffer A before being centrifuged again at the same speed for 10 min. The supernatant corresponded to the cytoplasmic extract. The pellet was then resuspended in a buffer B and then sonicated 10 times in a Potter-Elvehjem homogenizer (Kimble Kontes, Vineland, NJ, USA) with vigorous shaking for 30 min, and then centrifuged at 16 000  $g$  for 30 min. The supernatant corresponded to the nuclear extract. The protein quantification was performed and equal amounts of protein (150  $\mu\text{g}$ ) were used for each sample in the Western blot studies. Samples were treated with Laemmli buffer and were subjected to SDS/PAGE (10% Tris/acrylamide) in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus (Miniprotean; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), in parallel with pre-stained protein standards and  $\beta$ -mercaptoethanol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proteins were then electrotransferred from the gel to a Hybond ECL nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Bucks, UK) for 2 h at 120 V in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Miniprotean). After blocking, the membranes were then incubated overnight with

rabbit polyclonal anti-NF- $\kappa$ B subunit p65 at a concentration of 0.4  $\mu$ g/ $\mu$ l in a buffer with 3% BSA, and then washed three times as described above. The blots were then incubated with  $^{125}$ I-Protein A (Amersham Biosciences) and detected by autoradiography. Images of developed autoradiographs were scanned, and band intensities were quantified by optical densitometry using image-analysis software (Scion Image Analysis Software; Scion Corp, Frederick, MD, USA).

#### Determination of tear volume and of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ and insulin content in tears

Tear volume was measured in the animals of both study groups anaesthetized with an i.p. injection of sodium thiopental (100  $\mu$ g/kg; Cristália, Itapira, SP, Brazil) and used 10–15 min later, as soon as anaesthesia was assured by the loss of foot and corneal reflexes, using micropipettes (Eppendorf Research, Hamburg, Germany), and tears were collected and measured from the lacrimal meniscus, with an attempt made to collect the whole volume in one take and to avoid stimuli.

IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were measured in tears collected from aging and control rats with an ELISA kit according to the manufacturer's instructions (Pierce Endogen, Rockford, IL, USA). Tear samples from both eyes were pooled together.

For analysis of insulin secretion in tear film, tear samples were collected from rats fasted for 12 h. Tears were collected with graduated Pasteur pipettes from the ocular surface with minor manipulation, pooled from both eyes and transferred to Eppendorf tubes containing 50  $\mu$ l 0.9% NaCl. The samples were frozen at  $-75^{\circ}\text{C}$  until the RIA, as described previously (Rocha *et al.* 2002a).

#### Plasma glucose disappearance test ( $K_{ITT}$ )

To evaluate the plasma glucose disappearance rate in response to insulin injection, a test also known as the insulin-tolerance test, rats from both groups were anaesthetized with an i.p. injection of sodium thiopental, 100  $\mu$ g/kg body weight, and used 10–15 min later, as soon as anaesthesia was assured by loss of foot and corneal reflexes. Blood samples were collected from a caudal vein at 0 (basal glucose determination), 4, 8, 12 and 16 min after i.v. injection of 10  $\mu$ M insulin. The samples were analyzed by a glucose oxidase method (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil). Plasma glucose disappearance rate ( $K_{ITT}$ ) was calculated by the formula  $0.693/t_{1/2}$ . Plasma glucose half-life ( $t_{1/2}$ ) was calculated from the slope of the least-squares analyses of the plasma glucose concentrations during the linear phase of decline, as described previously (Rocha *et al.* 2002b).

#### Peroxidase assay

To compare peroxidase activity in LG samples from aging and young rats, the tissues were exposed to a protocol

described previously (Stoppiglia *et al.* 2002). Briefly, samples were homogenized in Hanks solution at  $4^{\circ}\text{C}$  and the homogenates were centrifuged at 10 000  $g$  for 8 min to remove cell membranes and organelles. The protein concentration of the supernatant was measured by the Biuret dye method (Labtest) and samples were collected and completed with Hanks solution to obtain 100  $\mu$ g/ml protein.  $\text{H}_2\text{O}_2$  was added at a final concentration of 4.4 mM to each sample and controls were run in parallel. Aliquots were collected at 0, 5, 10, 20, 30, 40 and 60 min and peroxidase activity was measured by colorimetry (Glucose GODPAP, Laborlab, Brazil), against a  $\text{H}_2\text{O}_2$  standard curve. Values were fitted with single exponential decay curves according to the formula:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] \cdot (t) = [\text{H}_2\text{O}_2]_{t=0} \times e^{-kt}$$

The peroxidase activity of each sample is represented by the  $k$  value ( $[\text{H}_2\text{O}_2]$  decay constant) obtained, expressed in  $\mu\text{M}/\text{min}$ .

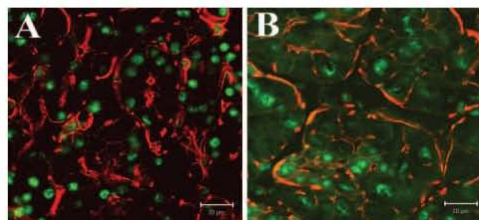
#### In vitro insulin secretion

Under anaesthesia, the pancreas and LGs were removed from young and aging rats. The tissues were incubated in Krebs bicarbonate buffer on separate Petri dishes for each experimental group and tissue. The pancreatic tissue was digested with collagenase to allow islet isolation, as described by Boschero *et al.* (1995) and LG tissue was cut into fragments with a mean diameter of 1 mm under a microscope using fine scissors. LG samples consisted of groups of two LG fragments that were first incubated in cell strainers for 45 min at  $37^{\circ}\text{C}$  in Krebs bicarbonate buffer containing 5.6 mM glucose and equilibrated with 95%  $\text{O}_2/5\% \text{CO}_2$ , pH 7.4. Samples of five islets were run in parallel for comparison. The solution was then replaced with fresh Krebs bicarbonate buffer and the islets were further incubated for 1 h with media of the following composition: 2.8, 8.3 or 16.7 mM glucose, 16.7 mM glucose combined with 20  $\mu$ g/ml diazoxide, 200 mM carbachol, and 200  $\mu$ M carbachol combined with 66  $\mu$ g/ml atropine or 40 mM  $\text{K}^+$ . The incubation medium contained 115 mM NaCl, 5 mM KCl, 24 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 2.56 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$  and 3 g/l BSA.

After the incubation period, the supernatant of each condition ( $n=5/\text{condition}$ ) and negative controls were collected and processed by RIA. To measure the total content of insulin in LGs and isolated islets, samples were homogenized with polytron PT1200C (Brinkmann Instruments, New York, NY, USA) in alcohol/acid solution (20% ethanol and 0.2 M HCl) and also processed for RIA.

#### Insulin quantification

The insulin content in tears, plasma, supernatant from *in vitro* experiments and homogenized tissues were



**Figure 1** Representative confocal microphotographs demonstrating NF-κB (p65 subunit) staining (green) in LGs of young (A) and aging (B) rats. The red is phalloidin counterstaining indicating the localization of actin in the acinar or ductal cell membrane. The findings are representative of two independent experiments ( $n=5/\text{group}$ ). Scale bars, 20  $\mu\text{m}$ .

measured by RIA. To ensure sensitivity, specificity and reproducibility of the method, the following procedures were performed: (i) curves with triplicate samples of commercially available insulin (Amersham Biosciences) were run in parallel, (ii) samples with similar dilutions of insulin-like growth factor-1 (Sigma) or containing buffer only were also analyzed and (iii) assay samples were run in duplicate. The sensitivity range was 0.1–20 ng/ml, and the interassay and intraassay coefficients of variation were estimated at 0.11 and 0.076, respectively.

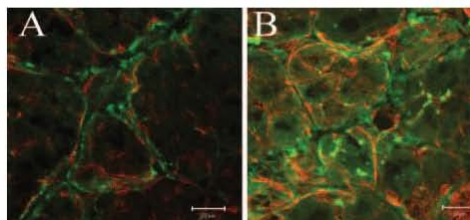
#### Statistical analysis

Data are reported as means  $\pm$  S.E.M. Comparisons were made using the Mann–Whitney  $U$  test (Statview Software, Abacus, CA, USA), with the level of significance set at  $P<0.05$ .

## Results

#### Immunohistochemical localization of NF-κB, AGEs and RAGE

To locate and compare the expression of NF-κB, AGEs and RAGE in LGs, samples from aging and control rats were processed in parallel and submitted to immunofluorescence by laser confocal microscopy ( $n=5$  animals/group). Histological analysis demonstrated cytoplasmic and nuclear NF-κB expression in acinar cells of LGs, with higher expression levels in nucleus and cytoplasm of LG acinar cells from aging animals compared with young on all slides examined (Fig. 1). AGE expression was observed in LG tissue samples, with more intense staining in the plasma membrane and cytoplasm of acinar cells and connective tissue of aging rats in all samples analyzed (Fig. 2). RAGE protein was also identified in LG tissues, predominantly with plasma membrane distribution in ductal cells and more intensely expressed in aging than in young rats (Fig. 3). RAGE expression in corneal

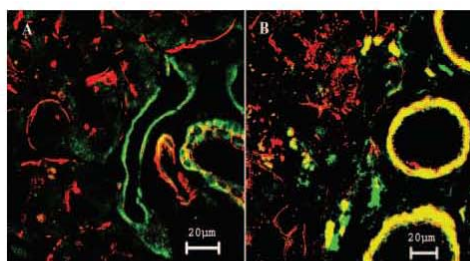


**Figure 2** Representative confocal microphotographs demonstrating AGE staining (green) in LGs of young (A) and aging (B) rats. The findings are representative of two independent experiments ( $n=5/\text{group}$ ). Scale bars, 20  $\mu\text{m}$ .

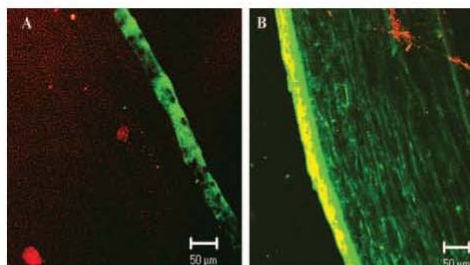
epithelium and stroma was also more intense in aging animals than in young, as observed on all slides from both groups (Fig. 4).

#### NF-κB expression in aging and young LGs

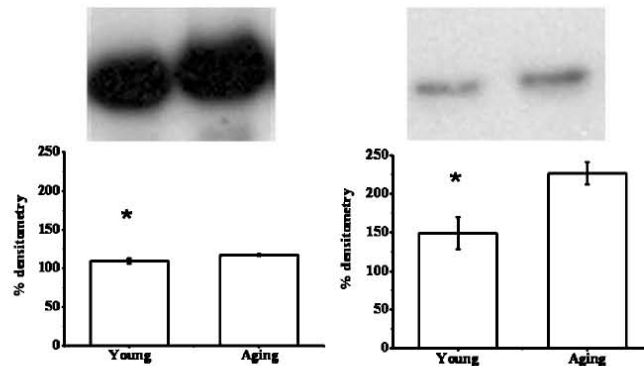
NF-κB protein was detected in nuclear and cytoplasmic extracts of LGs, and higher levels of expression were



**Figure 3** Representative confocal microphotographs demonstrating RAGE staining (green) in LGs of young (A) and aging (B) rats. The findings are representative of two independent experiments ( $n=5/\text{group}$ ). Scale bars, 20  $\mu\text{m}$ .



**Figure 4** Representative confocal microphotographs demonstrating RAGE staining (green) in the cornea of control (left) and aging rats (right). The findings are representative of two independent experiments ( $n=5/\text{group}$ ). Scale bars, 50  $\mu\text{m}$ .



**Figure 5** Effect of aging on NF-κB p65 expression in cytoplasmic (A) and nuclear (B) extracts of LGs. Cytoplasmic and nuclear extracts ( $n=6$  animals/group) were analyzed by Western blot using an anti-NF-κB antibody specific for the p65 subunit. Values are means  $\pm$  s.e.m. Values obtained for the young groups were defined as 100%, and values obtained for aging animals are expressed as a percentage of this value. Results are representative of two independent experiments. Higher expression of NF-κB p65 was detected in nuclear and cytoplasmic extracts of aging animals ( $P=0.02$ ).

detected in both nucleus and cytoplasmic extracts of aging animals compared with young ( $n=6$ /group;  $P=0.02$  in both cases). These results were confirmed in three independent experiments (Fig. 5).

*LG weight, tear volume and peroxidase activity*

Previous studies have demonstrated structural and functional changes in aging LGs (Bromberg & Welch 1985, Sullivan *et al.* 1990, Draper *et al.* 1999, 2003, Rocha *et al.* 2003). To ensure that this was the case in the present animal model, LG weight, tear volume and LG peroxidase activity were determined. Results are given in Table 1. The mean peroxidase activity levels were twice as high in young than in aging LGs ( $P=0.016$ ; see Table 1 for details).

**Table 1** Effect of aging on LG weight, body weight, basal tear volume,  $K_{ITT}$ , tear insulin level, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels and peroxidase activity of Wistar male rats. Means  $\pm$  s.e.m. are shown

	Aging	Young
LG weight (mg)	142.60 $\pm$ 12.75*	77.20 $\pm$ 4.09
Body weight (g)	408.8 $\pm$ 18.17*	280.8 $\pm$ 4.65
Tear volume ( $\mu$ l)	2.40 $\pm$ 0.25†	3.96 $\pm$ 0.42
$K_{ITT}$	3.15 $\pm$ 0.04†	4.65 $\pm$ 0.05
Tear insulin (ng/ml)	1.56 $\pm$ 0.38	0.83 $\pm$ 0.32
Tear IL-1 $\beta$ (pg/ml)	6.22 $\pm$ 0.15*	4.26 $\pm$ 0.18
Tear TNF- $\alpha$ (pg/ml)	239.10 $\pm$ 50.02	57.32 $\pm$ 12.68
Peroxidase activity ( $\mu$ M/min)	38.2 $\pm$ 6.7†	69.0 $\pm$ 15.0

\* $P<0.05$ , significantly higher than young; † $P<0.05$ , significantly lower than young.  $n=5$  for all parameters, except for tear volume where  $n=10$ .

*Insulin, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels in the tear film*

To investigate the metabolic and inflammatory consequences of aging for LGs, the content of insulin, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  was measured. The tear film insulin secretion in fasted rats was similar in both groups, with a tendency to higher levels in 24-month-old rats although, the difference was not statistically significant (Table 1). Both IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels were significantly greater in aging rats ( $P=0.007$  and  $0.05$ , respectively; Table 1).

*In vitro insulin secretion*

To determine whether LGs isolated from aging rats responded with insulin secretion in a similar way to young rats, assays were conducted with isolated LG samples exposed for 1 h to media containing secretagogues such as increased glucose levels (2.8–16.7 mM) and cholinergic (i.e. carbachol) or depolarizing (i.e.  $K^+$ ) stimulation ( $n=5$ /condition).

Mean insulin levels in the supernatant increased by 147% in medium containing 8.3 mM glucose compared with medium containing 2.8 mM glucose. Adding 200  $\mu$ M carbachol to the medium containing 8.3 mM glucose increased the mean level of insulin by 59%. Doubling the level of glucose in the medium from 8.3 to 16.7 mM increased the insulin level by 58%. The depolarizing effect of 40 mM KCl in medium containing 2.8 mM glucose increased the insulin levels by 61% compared with 2.8 mM glucose solely (Fig. 6). These experiments showed that insulin secretion in response to



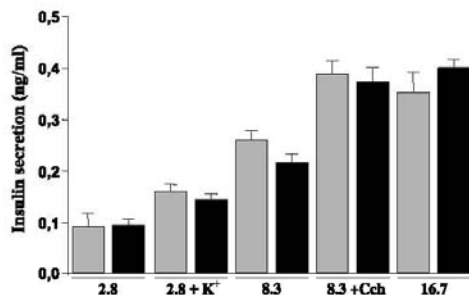


Figure 6 Insulin release (ng/ml) from samples containing two fragments of LG tissues from aging (black bars) and young (grey bars) Wistar rats, incubated under basal conditions (2.8 mM glucose; 2.8) or stimulated with 8.3 or 16.7 mM glucose (8.3, 16.7), 200  $\mu$ M carbachol plus 8.3 mM glucose (8.3+Cch), or 40 mM KCl plus 2.8 mM glucose (2.8+K<sup>+</sup>) for 1 h. Data are representative of at least three independent experiments ( $n=5$  samples/condition) and results are expressed as means  $\pm$  S.E.M.

higher glucose levels (2.8–16.7 mM) or to 200  $\mu$ M carbachol or 40 mM K<sup>+</sup> behaved in a similar manner, with no statistical significance between groups.

Similar assays performed with pancreatic islets revealed that the insulin secretion response to low (2.8 mM) or physiologic (8.3 mM) levels of glucose was reduced in aged animals, but was slightly higher in response to higher levels of glucose (16.7 mM;  $P=0.02$ , 0.021 and 0.08, respectively), and was similar when stimulated with 200  $\mu$ M carbachol or 40 mM K<sup>+</sup> (Fig. 7).

Comparison of total insulin content in LG tissue samples obtained from aging and young rats showed levels of 14.44  $\pm$  2.80 and 16.06  $\pm$  2.12 ng/ml, respectively ( $P=0.81$ ). The mean level in pancreatic islet samples was

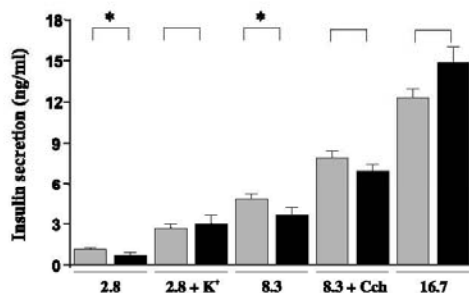


Figure 7 Insulin concentration (ng/ml) in the supernatant of pancreatic islets of aging (black bars) and young (grey bars) rats incubated under basal conditions (2.8 mM glucose) or stimulated with 8.3 and 16.7 mM glucose, 200  $\mu$ M carbachol plus 8.3 mM glucose, or 40 mM KCl plus 2.8 mM glucose for 1 h (column labels are as for Fig. 6). Data are representative of at least three independent experiments ( $n=5$  samples/condition) and results are expressed as means  $\pm$  S.E.M. \* $P<0.05$ , young versus aging rats.

1075.0  $\pm$  106.10 and 1738.0  $\pm$  150.0 ng/sample in the young and aging groups, respectively ( $P=0.007$ ).

## Discussion

The lower tear volume and peroxidase activity described here indicate a reduced secretory capacity with aging in rats, as reported previously (Bromberg & Welch 1985, Sullivan *et al.* 1990, Draper *et al.* 1999). In the present study, we demonstrated the presence of high levels of AGE and RAGE expression in LGs and RAGE in corneas of aging compared with young rats. Previous studies have reported that these mediators accumulate as a consequence of chronic hyperglycemia, are involved in widespread age-related pathology, and correlate with impaired hormone and growth factor signaling impairment, pro-inflammatory mediator recruitment and vascular damage (Vlassara *et al.* 1994, Stitt 2001, Portero-Otin *et al.* 2002).

In the present study, the mean LG weight of 24-month-old rats was significantly higher than in 2-month-old rats. This finding, apparently in conflict with a reduction in various functional parameters, may be explained by the acinar area replacement by connective tissue and reduction of metabolic, vascular and neural inputs over the secretory tissue. By 3 months of age, in spite of a stabilization, after a rapid increase in the LG weight there is a reduction in acinar density and the capacity to respond to cholinergic stimulation (Sullivan *et al.* 1990, Draper *et al.* 1999).

Although higher levels of NF- $\kappa$ B expression were clearly demonstrated in the nuclear area of acinar cells in aging LGs, we could only demonstrate a trend towards higher levels of NF- $\kappa$ B-induced downstream pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the tear film of aged rats. This finding may be explained, at least in part, by the wide range of values obtained in the assays for these cytokines. Since inflammation has been linked previously to age-related LG dysfunction in humans, and the expression of AGEs and NF- $\kappa$ B leads to an increase in the production of these pro-inflammatory cytokines, it is our opinion that further studies are necessary before the contribution of these inflammatory mediators to LG dysfunction in aging is definitely ruled out (Damato *et al.* 1984, Evans *et al.* 2002).

Insulin secretion by the LGs has been described previously, and is believed to be a mechanism by which this hormone is delivered to the ocular surface through the tear film (Rocha *et al.* 2002a). Therefore, our hypothesis was that LG dysfunction of aging would be associated with impairment of insulin secretion. In fact, old rats have higher insulin levels in pancreatic islets and blood, but they are heavier and have a reduced capacity for glucose storage, as observed here and elsewhere (Rocha *et al.* 2003). In a previous study, we have shown that aging is accompanied by reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in LGs, an event that also occurs in liver, muscle and the central nervous system and may account in

part for the dysfunction of these tissue, indicating a lower capacity of insulin intake and secretion by exocrine glands (Carvalho *et al.* 1996). These phenomena may be explained by the reduced capacity of response of pancreatic  $\beta$ -cells and by the insulin resistance occurring in aging (Castro *et al.* 1993, Carvalho *et al.* 1996, Rocha *et al.* 2003, 2004). However, the similarity of insulin content and secretion by LGs in the aging and young groups may suggest mechanisms to preserve the levels offered to the LGs and ocular surface, and supports the theory that this hormone is a key element for LGs and ocular surface maintenance (Hann *et al.* 1991).

In conclusion, this study provides evidence for the hypothesis that the cumulative formation of AGEs and RAGEs, and the activation of NF- $\kappa$ B, may be involved in the physiopathology of LG dysfunction of aging. Moreover, it confirms previous findings that metabolic alterations may lead to these dysfunctions, although insulin resistance does not impair insulin secretion by LGs in this model. Ongoing studies will help to elucidate whether any of these steps could be a target for therapeutic interventions that could avoid or reverse these events.

#### Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and CNPq. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

#### References

- Boschero AC, Szpak-Glazman M, Carneiro EM, Bordin S, Paul I, Rojas E & Atwater I 1995 Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* **268** E336–E342.
- Bromberg BB & Welch MH 1985 Lacrimal protein secretion: comparison of young and old rats. *Experimental Eye Research* **40** 313–320.
- Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA & Saad MJ 1996 Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* **137** 151–159.
- Castro M, Pedrosa D & Osuna JI 1993 Impaired insulin release in aging rats: metabolic and ionic events. *Experientia* **49** 850–853.
- Damato BE, Allan D, Murray SB & Lee WR 1984 Senile atrophy of the human lacrimal gland: the contribution of chronic inflammatory disease. *British Journal of Ophthalmology* **68** 674–680.
- Draper CE, Adeghate EA, Singh J & Pallot DJ 1999 Evidence to suggest morphological and physiological alterations of lacrimal gland acini with ageing. *Experimental Eye Research* **68** 265–276.
- Draper CE, Singh J & Adeghate 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.
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA & Grodzky GM 2002 Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews* **23** 599–622.
- Hann LE, Kelleher RS & Sullivan DA 1991 Influence of culture conditions on the androgen control of secretory component production by acinar cells from the rat lacrimal gland. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences* **32** 2610–2621.
- Mathers WD, Lane JA & Zimmerman MB 1996 Tear film changes associated with normal aging. *Cornea* **15** 229–234.
- McGill JJ, Liakos GM, Goulding N & Seal DV 1984 Normal tear protein profiles and age-related changes. *British Journal of Ophthalmology* **68** 316–320.
- Paez-Espinosa EV, Rocha EM, Velloso LA, Boschero AC & Saad MJ 1999 Insulin-induced tyrosine phosphorylation of Shc in liver, muscle and adipose tissue of insulin resistant rats. *Molecular and Cellular Endocrinology* **156** 121–129.
- Perfetti R, Rafizadeh CM, Liotta AS & Egan JM 1995 Age-dependent reduction in insulin secretion and insulin mRNA in isolated islets from rats. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* **269** E983–E990.
- Pongor S, Ulrich PC, Bencsath FA & Cerami A 1984 Aging of proteins: isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. *PNAS* **81** 2684–2688.
- Portero-Otin M, Pamplona R, Bellmunt MJ, Ruiz MC, Prat J, Salvayre R & Negre-Salvayre A 2002 Advanced glycation end product precursors impair epidermal growth factor receptor signaling. *Diabetes* **51** 1535–1542.
- Rocha EM, Wickham LA, 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 Sjogren's syndrome. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **438** 485–491.
- Rocha EM, de MLMH, Carvalho CR, Saad MJ & Velloso LA 2000 Characterization of the insulin-signaling pathway in lacrimal and salivary glands of rats. *Current Eye Research* **21** 833–842.
- Rocha EM, Cunha DA, Carneiro EM, Boschero AC, Saad MJ & Velloso LA 2002a Identification of insulin in the tear film and insulin receptor and IGF-1 receptor on the human ocular surface. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences* **43** 963–967.
- Rocha EM, Hirata AE, Carneiro EM, Saad MJ & Velloso LA 2002b Impact of gender on insulin signaling pathway in lacrimal and salivary glands of rats. *Endocrine* **18** 191–199.
- Rocha EM, Carvalho CR, Saad MJ & 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 EM, Fernandes MLA & Velloso LA 2004 Insulin signaling in aging nervous system. In *Advances in Cell Aging and Gerontology: Protein Phosphorylation in Aging and Age-Related Disease*, vol. 16, pp 107–132. Ed. MP Mattson. Amsterdam: Elsevier.
- Schein OD, Munoz B, Tielsch JM, Bandeen-Roche K & West S 1997 Prevalence of dry eye among the elderly. *American Journal of Ophthalmology* **124** 723–728.
- Singh R, Barden A, Mori T & Beilin L 2001 Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* **44** 129–146.
- Solomon A, Dursun 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. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences* **42** 2283–2292.
- Stitt AW 2001 Advanced glycation: an important pathological event in diabetic and age related ocular disease. *British Journal of Ophthalmology* **85** 746–753.
- Stoppiglia LF, Nogueira TA, Leite AR, Carneiro EM & Boschero AC 2002 Protective effect of D-glucose, L-leucine and fetal calf serum against oxidative stress in neonatal pancreatic islets. *Biochimica et Biophysica Acta* **1588** 113–118.
- Sullivan DA, Hann LE, Yee L & Allansmith MR 1990 Age- and gender-related influence on the lacrimal gland and tears. *Acta Ophthalmologica (Copenhagen)* **68** 188–194.
- Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell Jr JE, Stoffel M & Friedman JM 1996 Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus

- of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nature Genetics* **14** 95–97.
- Vlassara H, Bucala R. & Striker L 1994 Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Laboratory Investigation* **70** 138–151.
- Zarina S, Zhao HR. & Abraham EC 2000 Advanced glycation end products in human senile and diabetic cataractous lenses. *Molecular and Cellular Biochemistry* **210** 29–34.
- Zoukhri D, Hodges RR, Byon D & Kublin CL 2002 Role of proinflammatory cytokines in the impaired lacrimation associated with autoimmune xerophthalmia. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences* **43** 1429–1436.

Received in final form 2 July 2005

Accepted 13 July 2005