

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



**MARCELA ALDROVANI RODRIGUES**

**“Organização supramolecular, orientação espacial e propriedades ópticas de proteínas extracelulares em córneas e aortas de camundongos espontaneamente diabéticos”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Marcela Aldrovani Rodrigues  
Rodrigues  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

Campinas, 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**R818o**

Rodrigues, Marcela Aldrovani  
Organização supramolecular, orientação espacial e propriedades ópticas de proteínas extracelulares em córneas e aortas de camundongos / Marcela Aldrovani Rodrigues. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Benedicto de Campos Vidal.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Aorta. 2. Camundongo. 3. Córnea. 4. Diabetes.  
5. Matriz extracelular. I. Vidal, Benedicto de Campos. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
III. Título.

**Título em inglês:** Supramolecular organization, spatial orientation and optical properties of extracellular proteins in corneas and aortas from diabetic spontaneous mice.

**Palavras-chave em inglês:** Aorta; Mice; Cornea; Diabetes; Extracellular matrix.

**Área de concentração:** Biologia Celular.

**Titulação:** Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Benedicto de Campos Vidal, Antonella Sachside Braga Vilela, Ana Maria Aparecida Guaraldo, Sérgio Peres Line, Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira.

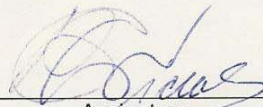
**Data da defesa:** 20/04/2007.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural.

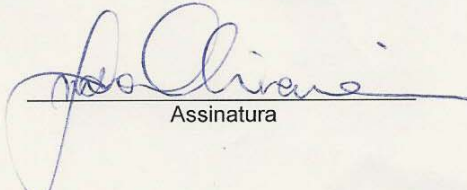
Campinas, 20 de abril de 2007.

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal (Orientador)

  
Assinatura

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

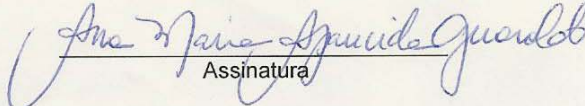
  
Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

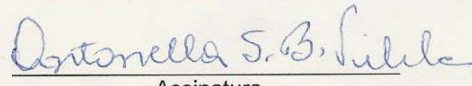
---

Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

  
Assinatura

Profa. Dra. Antonella Sachsida Braga Vilela

  
Assinatura

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling

---

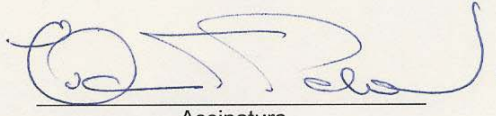
Assinatura

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

---

Assinatura

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari

  
Assinatura

“Casei-me com os números, tornei-me amante das letras e numa noite de orgia mágica fui fecundada. Agora penso: Meu Deus, o que será dessa criança? Templo do caos, qual será seu sobrenome? E seus olhos? Circuitos elétricos ou faísca lunar? Ó pai, tende piedade da minha garota... grávida! Grávida da lógica e da arte, grávida da CIÊNCIA e da INSPIRAÇÃO! Seus cérebros, num chip, nas super-cordas de seu corpo, nas pontas dos dedos? Sofrerá a dor da dúvida, será a fenda entre a razão e o instinto? Talvez ela entenda o que diz no pingente de meu cordão: PHILOS SOPHIE.”

(Larissa Alfonsi)

## **AGRADECIMENTOS**

---

Ao senhor meu *DEUS* pela vida e oportunidades concedidas.

À minha mãe Maria de Lourdes pelo apoio irrestrito.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal pela amizade, oportunidades, ensinamentos, incentivo e confiança.

À Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello pela amizade, incentivo e exemplo de conduta científica.

À Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo pelo fornecimento dos camundongos NOD/Uni utilizados neste estudo, pelas sugestões no exame de qualificação e na análise prévia desta tese, e pelas palavras de apoio irrestrito em todos os nossos encontros.

À Profa. Dra. Toshie Kawano e ao Sr. Alexander Seixas de Souza pelo auxílio nas análises envolvendo microscopia confocal.

À Profa. Dra. Yara Michelacci pelas valiosas sugestões na análise prévia desta tese.

À Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira pela amizade e apoio sempre.

À Profa. Dra. Maria Astride Saad Corradi por ser um exemplo de conduta a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel pelas sugestões pertinentes no exame de qualificação, pela amizade e nobreza de seu caráter.

A Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höffling e a doutoranda Karina Fontana pela amizade e parceria científica.

Ao Prof. Dr. Sérgio Peres Line pelas sugestões que muito contribuíram para enriquecer o projeto de pesquisa apresentado como requisito ao exame de qualificação na modalidade doutorado.

A Sra. Liliam Panagio pelos préstimos e amizade.

Aos Sr. Mário Bianchi pelos préstimos.

Ao Sr. Adílson, bioterista do Departamento de Biologia Celular, pela educação, auxílio nos cuidados para com os animais e pela amizade.

A Sra. Martha Almeida, técnica do Laboratório de Biopolímeros e Supra-organização Cromatínica, pela amizade e préstimos.

Aos estagiários do Laboratório de Biopolímeros e Supra-organização Cromatínica pelo convívio agradável – James, Marina e Martha.

Aos amigos Alberto da Silva Moraes, Antonella Sachsida, Cristiane Matsuo, Flávia Gerelli, Flávia de Paoli, Juliana Gobbo, Legilane Sanches, Letícia Cruz, Rafaela Carvalho e Roberta Carrijo:

“Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivesse morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos! A alguns deles não procuro, basta-me saber que eles existem. Esta mera condição me encoraja a seguir em frente pela vida... mas é delicioso que eles saibam e sintam que os adoro, embora não declare e não os procure sempre.” (Fernando Pessoa)

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste estudo.

**Ao Dr. Vidal***Mensagem Kardecista de Amizade*

É muito bom poder contar com a sua amizade, pois sinto que em você predomina o desejo do Bem, pois sinto que você já passou por muitas reencarnações, que o seu processo de aprimoramento já eliminou a maior parte das imperfeições que todos nós carregamos ao sermos criados. Você é um grande amigo, sabe ajudar e amar o próximo. Percebo-lhe feliz, mesmo entendendo que, às vezes, as agruras do mundo físico o deixem um tanto abalado. Sei o quanto você é generoso. Percebo o quanto de sincera entrega existe em cada ato de caridade que você pratica. Sinto o quanto você se empenha na construção do universo e sei que você não está no mundo apenas como espectador, mas como um ser participante, que sabe o quanto é importante seguir a lei de "nascer, morrer, renascer e progredir sem cessar". Apesar da minha simplicidade e ignorância, já consigo entender que você é um ser muito especial, e sinto-me privilegiado em poder conviver contigo neste mundo.

---



# ÍNDICE

---

ABREVIATURAS & SÍMBOLOS.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	16
INTRODUÇÃO.....	19
JUSTIFICATIVA & OBJETIVOS.....	52
REFERÊNCIAS.....	55
ARTIGOS.....	69
ARTIGO I.....	72
ARTIGO II.....	109
CONCLUSÕES.....	132
ANEXO.....	135

## **ABREVIATURAS & SÍMBOLOS**

---

<b>AGEs</b>	produtos finais de glicosilação avançada; advanced glycosylation end-products
<b>BALB/C</b>	camundongos não-diabéticos; healthy mice
<b>A<sub>PA</sub></b>	parallel absorption
<b>A<sub>PE</sub></b>	perpendicular absorption
<b>ANS</b>	1-anilino-8-sulfato de naftaleno; 1-anilino-8-naphthalene sulphonate
<b>AT</b>	azul de toluidina
<b>DR</b>	dichroic ratio
<b>ECM</b>	extracellular matrix
<b>EVLP</b>	azimuth of the electric vector of the polarizer
<b>GAGs</b>	glicosaminoglicanos
<b>LD</b>	linear dichroism
<b>MEC</b>	matriz extracelular
<b>NBT</b>	azul de nitro-tetrazólio, nitroblue tetrazolium
<b>NOD</b>	camundongos diabéticos não-obesos; nonobese diabetic mice
<b>PGs</b>	proteoglicanos; proteoglycans
<b>PPL</b>	plane of polarized light
<b>OR</b>	optical retardation
<b>RO</b>	retardo óptico
<b>n<sub>D</sub></b>	índice de refração; refractive indices
<b>SMC</b>	smooth muscle cell
<b>λ</b>	comprimento de onda; wavelengths

## **RESUMO**

---

*Diabetes mellitus* é uma doença crônica que afeta o metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas. Sua principal característica é a hiperglicemia devido à produção insuficiente de insulina ou a defeitos na resposta à insulina pelos tecidos periféricos. A hiperglicemia, quando muito acentuada, induz glicosilação não-enzimática de proteínas, que é responsável pela formação de produtos finais de glicosilação não-enzimática (AGEs) e de ligações cruzadas intermoleculares. Neste estudo, organização supramolecular, orientação espacial e propriedades ópticas foram investigadas em proteínas extracelulares da córnea e da aorta de camundongos diabéticos não-obesos (NOD) e não diabéticos (BALB/c).

CÓRNEAS: Birrefringência e dicroísmo linear foram investigados em fibras colágenas do estroma corneal de camundongos NOD/Uni e BALB/c/Uni. A contribuição de proteoglicanos do estroma para as anisotropias da córnea também foi investigada. Retardo óptico foi medido em fibras colágenas de córneas intactas e seccionadas com 8  $\mu\text{m}$  de espessura (sem coloração). Dicroísmo linear e índices dicróticos foram investigados em cortes de córnea corados com ponceau SS pH 2.5 e azul de toluidina pH 4.0, usando microespectrofotômetro de varredura e diferentes comprimentos de onda obtidos com régua monocromática. Análise morfológica das birrefringências revelou que fibras colágenas de camundongos NOD e BALB/c estão intercruzadas em vários planos espaciais e orientadas em mais que uma direção ao longo da trajetória corneal. Córneas de NOD apresentaram maiores valores de retardo óptico das birrefringências que o controle. Fibras colágenas coradas com ponceau SS apresentaram valores positivos de dicroísmo linear e índice dicrótico. Esses valores foram maiores para

as córneas de NOD. Após coloração com azul de toluidina, córneas de NOD e BALB/c apresentaram reação metacromática devido à presença de grupamentos aniônicos (glicosaminoglicanos de proteoglicanos) no estroma; e valores negativos de dicróismo linear e índice dicróico. Não foi verificada diferença significativa entre córneas de NOD e BALB/c coradas com azul de toluidina. Esses resultados sugerem que o *diabetes* foi capaz de alterar as anisotropias ópticas da córnea, possivelmente por aumentar o empacotamento molecular das fibras colágenas. Entretanto, o *diabetes* não alterou a organização espacial dos proteoglicanos do estroma. AORTAS: Ocorrência de glicosilação não-enzimática foi verificada em aortas abdominais de camundongos NOD/Uni, usando azul de nitro-tetrazólio (NBT). Alterações moleculares e estruturais foram investigadas em lâminas elásticas e fibras colágenas, após colorações com cloreto de danzila e anilino-sulfato naftaleno (ANS). Alterações em auto-fluorescência e birrefringência arterial foram investigadas em aortas sem coloração. Proliferação de células musculares lisas também foi investigada em amostras coradas com a reação de Feulgen, usando microscopia confocal e análise de imagem. NBT demonstrou a formação de produtos de glicosilação (frutosamina) na matriz extracelular da aorta de NOD. Lâminas elásticas e fibras colágenas da aorta de NOD apresentaram fluorescência menos intensa que o controle, após colorações com cloreto de danzila e ANS. Entretanto, a auto-fluorescência arterial foi maior nos camundongos NOD. Análise da birrefringência revelou alterações no empacotamento molecular das fibras colágenas da aorta NOD. Nenhuma evidência de proliferação de células musculares lisas foi observada em aortas NOD coradas com a reação de Feulgen.

## **ABSTRACT**

---



*Diabetes mellitus* is a chronic disorder of the carbohydrate, lipids and protein metabolism. A characteristic feature of this disorder is the hyperglycemia due to a deficient insulin production or to metabolic defects on its response in peripheral tissues. Hyperglycemia induces non-enzymatic glycosylation of proteins, which is responsible for advanced glycosylation end-products (AGEs), and intermolecular crosslinks reactions. In this study, supramolecular organization, spatial orientation and optical properties were investigated in extracellular proteins of the cornea and of the abdominal aorta from nonobese diabetic (NOD) mice and non-diabetic mice (BALB/c). CORNEAS: Birefringence and linear dichroism were investigated in corneal stroma collagen fibers from nonobese NOD/Uni mice and BALB/c/Uni mice. The contribution of stroma proteoglycans to optical anisotropies of the cornea was also investigated in NOD and BALB/c mice. Birefringence optical retardations were measured in stroma collagen fibers of unstained whole and sectioned (8  $\mu\text{m}$ ) corneas. Linear dichroism and dichroic ratios were investigated in cornea sections stained with ponceau SS pH 2.5 and toluidine blue pH 4.0, using scanning microspectrophotometer and different wavelengths that were obtained with a monochromator filter ruler. Morphological analysis of the birefringences revealed that NOD and BALB/c stroma collagen fibers are intercrossed in different spatial planes and oriented in more that one direction along the corneal trajectories. NOD corneas showed higher birefringence optical retardation values than the control. Ponceau SS-complexed collagen fibers showed positive linear dichroism and dichroic ratios values that were higher for NOD corneas. After staining with toluidine blue, NOD and BALB/c corneas showed metachromatic

reaction verifying the presence of anionic groups (proteoglycan glycosaminoglycans) in the stroma, and negative linear dichroism values. No significant difference was observed between NOD and BALB/c corneas stained with toluidine blue. These results demonstrate that *diabetes* was capable of altering the optical anisotropies of the cornea, possibly to increase the number of intermolecular crosslinks in stroma collagen fibers, making them more crystalline and aggregate than the control. However, *diabetes* did not affect the spatial organization of the stroma proteoglycans. AORTAS: Nonenzymatic glycosylation was assessed in aorta extracellular matrix from NOD/Uni mice, using nitroblue tetrazolium (NBT). Molecular and structural changes were investigated in elastic lamellae and collagen fibers of diabetic mice aortas, after staining with dansyl chloride and anilinonaphthalene sulfonate (ANS). Alterations in arterial autofluorescence and birefringence of collagen fibers were investigated in unstained aortas. Smooth muscle cells proliferation was also investigated by confocal microscopy and image analysis, after Feulgen reaction. Assessment of nonenzymatic glycosylation demonstrated glycosylation products formation in the aorta extracellular matrix from NOD mice. Elastic lamellae and collagen fibers from diabetic aortas presented less intense fluorescence after staining with dansyl chloride and ANS when compared to controls. However unstained NOD aortas showed more intense autofluorescence when compared to controls. Birefringence analysis suggests alterations in the higher molecular packing of the arterial collagen fibers in diabetic aortas. In aortas stained by Feulgen reaction no evidence of smooth muscle cells proliferation was observed in diabetic aortas.

## **INTRODUÇÃO**

---

## DIABETES E GLICOSILAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA

O *diabetes* é uma doença tão antiga quanto a própria humanidade (CARVALHO, 1996). O primeiro relato da doença data de 1500 anos antes de CRISTO, em um documento egípcio chamado papiro de EBNERS, e faz referência a um sintoma clínico comumente apresentado por indivíduos diabéticos: a freqüente e abundante emissão de urina (*apud* ARDUÍNO, 1962). Já na década de 50 da era cristã, CELSUS referiu-se ao *diabetes* como uma poliúria indolor, porém perigosa. Dois séculos depois, o médico romano ARETAEUS descreveu uma doença, cujos principais sintomas eram eliminação copiosa de urina, sede incontrollável e emagrecimento. Nesta mesma época (131-201d.C) GALEANO descreveu o *diabetes* como uma fraqueza dos rins. Do século III ao VI d.C, o *diabetes* foi descrito nos VEDAS (livros sagrados da Índia) como uma condição de poliúria e urina doce. Posteriormente CAWLEY, em 1788, descreveu a relação causal entre *diabetes* e pâncreas, ao verificar destruição pancreática durante a necropsia de um paciente diabético. Cinquenta anos depois, AMBROSIANI (1835), pela primeira vez, constatou que o sangue de pacientes diabéticos contém mais açúcar que o de pacientes não-diabéticos. Em 1862, BRUNNER observou que a remoção total do pâncreas causava poliúria e polidipsia, porém não correlacionou esse achado com o *diabetes* (*apud* CARVALHO, 1996). Anos mais tarde, LANGHERANS (1869) descobriu as hoje denominadas “ilhotas de Langherans” no tecido pancreático, porém as confundiu com gânglios linfáticos. Por fim, MASSIGLIA (1912) demonstrou

que a destruição das ilhotas causava glicosúria, e os jovens cirurgiões BANTING & BEST (1921) descobriram e isolaram a insulina verificando, posteriormente, que sua injeção intravenosa diminuiu os níveis de glicose sanguínea em cães submetidos a pancreactomia. Ainda em 1921, COLLINS, pela primeira vez, injetou extrato de pâncreas (insulina) em um menino diabético, conseguindo controlar seus níveis de glicemia (*apud* ARDUÍNO, 1962).

O pâncreas é uma glândula mista, ou seja, tanto de secreção exócrina como endócrina. Sua porção endócrina é constituída por aproximadamente um milhão de unidades microscópicas denominadas “ilhotas de Langherans ou pancreáticas”. Em mamíferos, cada ilhota é formada por quatro diferentes tipos de células variando de poligonais a arredondadas, das quais 60-80% são células beta que sintetizam e secretam a insulina (GANONG, 1977).

A insulina é um hormônio polipeptídico constituído por duas cadeias de aminoácidos conectadas por pontes de dissulfetos. Este hormônio tem importante função no armazenamento de glicogênio, no transporte de aminoácidos e na síntese de ácidos graxos, DNA, RNA e proteínas (ANDERSON et al., 1994). Quando, as células beta deixam de produzir insulina, por fatores hereditários ou relacionados à obesidade, surge um quadro clínico denominado *diabetes mellitus* (GANONG, 1977).

Em humanos, duas formas clínicas de *diabetes mellitus* foram descritas: 1) o *diabetes mellitus* dependente de insulina ou tipo I (infanto-juvenil), resultante de um processo destrutivo, freqüentemente autoimune, que ocasiona deficiência absoluta da produção de insulina e 2) o *diabetes melittus* não-dependente de

insulina ou tipo II (adulto) que resulta de alterações no receptor de insulina ou em uma, dentre as várias enzimas, envolvidas na transdução intracelular do sinal da insulina. O diabetes tipo II também pode resultar da deficiência parcial da produção de insulina o que, geralmente, está associado à obesidade (AHMED, 2005).

Levantamentos estatísticos mostram que, no ano de 1996, o *diabetes* tipo I se manifestava em aproximadamente 10% dos pacientes diabéticos do ocidente, debilitando seus portadores e, em alguns casos, obrigando-os a se afastarem de suas atividades profissionais (STEFAN, 1996). Nesse mesmo ano, nos Estados Unidos, o *diabetes* foi responsável por 2% dos óbitos registrados, estando entre as dez doenças que mais ocasionaram morte nesse país (STEFAN, 1996). Estima-se que, atualmente, o *diabetes* afete cerca de 1-2% da população mundial (AHMED, 2005).

Nos últimos anos vários estudos têm sido realizados na tentativa de descrever e/ou elucidar a patogenia das complicações sistêmicas que acompanham o *diabetes* e determinar se elas podem ser revertidas por tratamentos farmacológicos e/ou dieta nutricional. Para isso, o uso experimental de animais fenotipicamente diabéticos, seja por indução química (estrepzotocina ou aloxana) ou por expressão natural, tornou-se comum (STEFAN, 1996). Dentre os animais utilizados nesses estudos, os modelos murinos, em especial camundongos diabéticos não-obesos (NOD), têm contribuído significativamente para o avanço das pesquisas.

Aproximadamente 80% das fêmeas e 20% dos machos da linhagem NOD desenvolvem uma forma de *diabetes* autoimune (tipo I) muito parecida com a doença manifestada por humanos. Isto porque esses animais, assim como humanos, possuem várias combinações de alelos aparentemente normais e numerosos *loci* recessivos associados à doença. De modo geral, a expressão do *diabetes* em camundongos NOD resulta de uma complexa interação que envolve genes do complexo maior de histocompatibilidade e afeta a auto-tolerância e a imunorregulação, promovendo o recrutamento de linfócitos T CD<sup>4+</sup> e CD<sup>8+</sup> pelas ilhotas de Langherans e a autodestruição das células beta pancreáticas (YANG & SANTAMARIA, 2003).

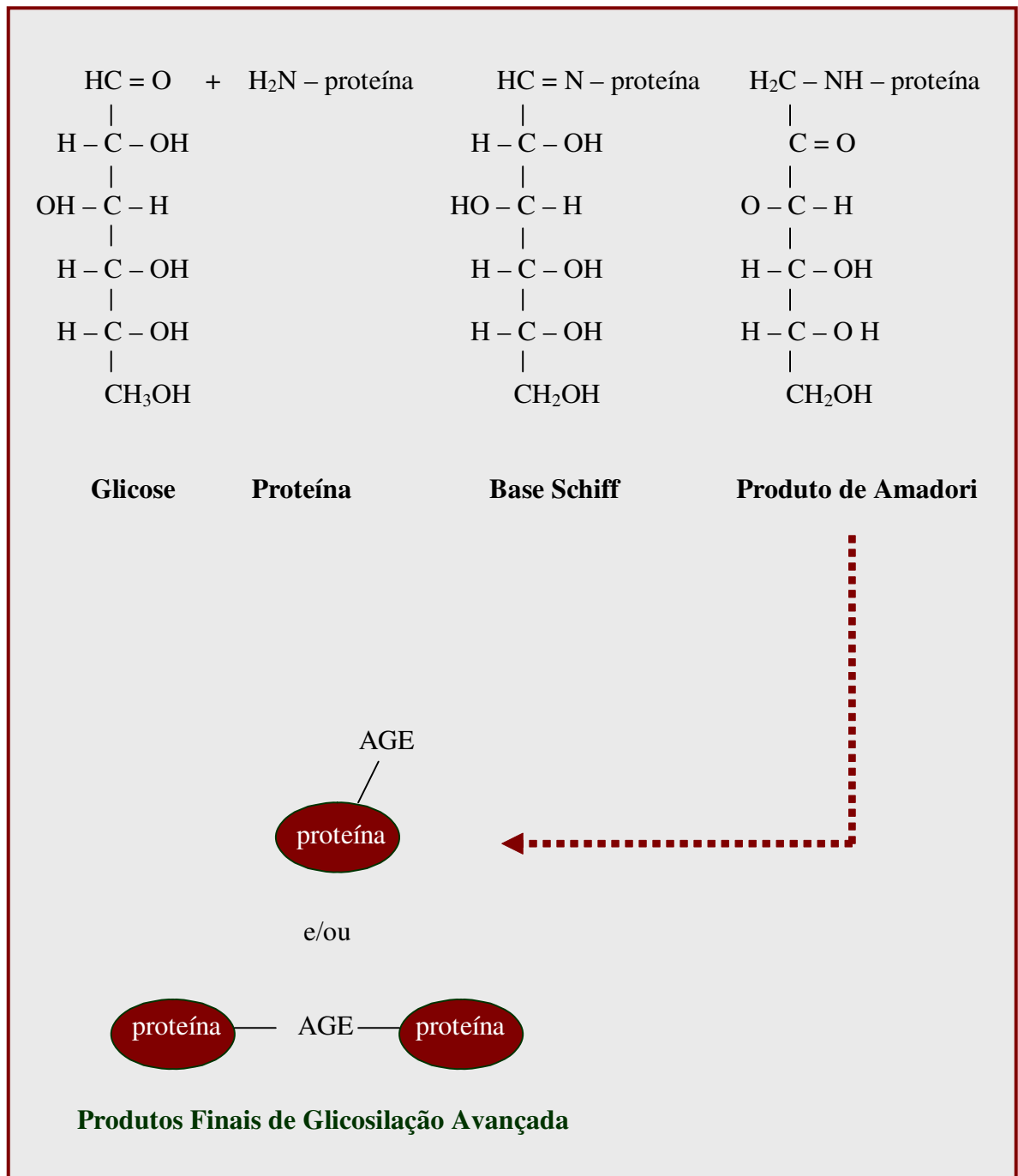
Assim como pacientes diabéticos, camundongos NOD manifestam vários sintomas, sendo que os mais comuns são poliúria, perda de peso, glicosúria, cetose, acidose e hiperglicemia. Embora todos esses sintomas clínicos sejam fundamentais para o diagnóstico da doença, especial relevância tem sido atribuída à hiperglicemia, pois grande parte da comunidade científica acredita que todos os demais sintomas surgem em decorrência dela (GANONG, 1977). Há um consenso de que a hiperglicemia seria um dentre os muitos fatores, alguns deles ainda desconhecidos, que contribui significativamente para a patogenia das complicações sistêmicas que acompanham o *diabetes*.

A hiperglicemia em si é relativamente inócua, a não ser quando ela é muito acentuada (GANONG, 1977). Neste caso, a glicose excedente no sangue é, em grande parte, incorporada às biomoléculas por uma via atípica que independe de um mecanismo enzimático de caráter fisiológico. Geralmente essa via é referida

como glicosilação não-enzimática ou reação Maillard (BAILEY *et al.*, 1998; BISHARA *et al.*, 2002). Dentre as biomoléculas susceptíveis a glicosilação não-enzimática destacam-se os nucleotídeos, os lipídios estruturais, os carboidratos e as proteínas intra e extracelulares.

Na glicosilação não-enzimática de proteínas, o grupo aldeído da glicose reage com a amina livre de uma proteína, formando em poucas horas, uma base Schiff reversível que, por sua vez, sofre um rearranjo para formar um produto de Amadori (BROWNLEE *et al.*, 1988; VLASSARA, 1994). O produto de Amadori é irreversível e, após longo período de tempo, pode originar produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) (FIG. 1) capazes de desencadear ligações cruzadas intra e intermoleculares (ANDREASSEN *et al.*, 1988). Ligações cruzadas desencadeadas por AGEs afetam o funcionamento de proteínas, aumentam a resistência dos peptídeos à degradação proteolítica (CLOOS & CHRISTGAU, 2002) e diminuem a flexibilidade e a permeabilidade dos tecidos (BAILEY *et al.*, 1998). Aparentemente, a glicosilação não-enzimática é mais efetiva em proteínas que possuem longo período de atividade biológica. Estudos anteriores verificaram que a glicosilação não-enzimática aumenta com o avançar da idade, ocasionando acúmulo de pentosidinas na matriz extracelular (MEC) humana e, conseqüentemente, uma série de alterações deletérias que contribuem para as patologias do envelhecimento (SCHNIDER & KOHN, 1982; MONNIER, 1989). Em pacientes diabéticos, essas alterações são aceleradas pela hiperglicemia e correspondem às causas principais da morbidade e mortalidade prematura destes indivíduos (DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL, 1993).





**FIGURA 1** – Glicosilação não-enzimática de uma proteína genérica e a subsequente formação dos produtos finais de glicosilação avançada (AHMED, 2005).

## CONSIDERAÇÕES SOBRE A MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

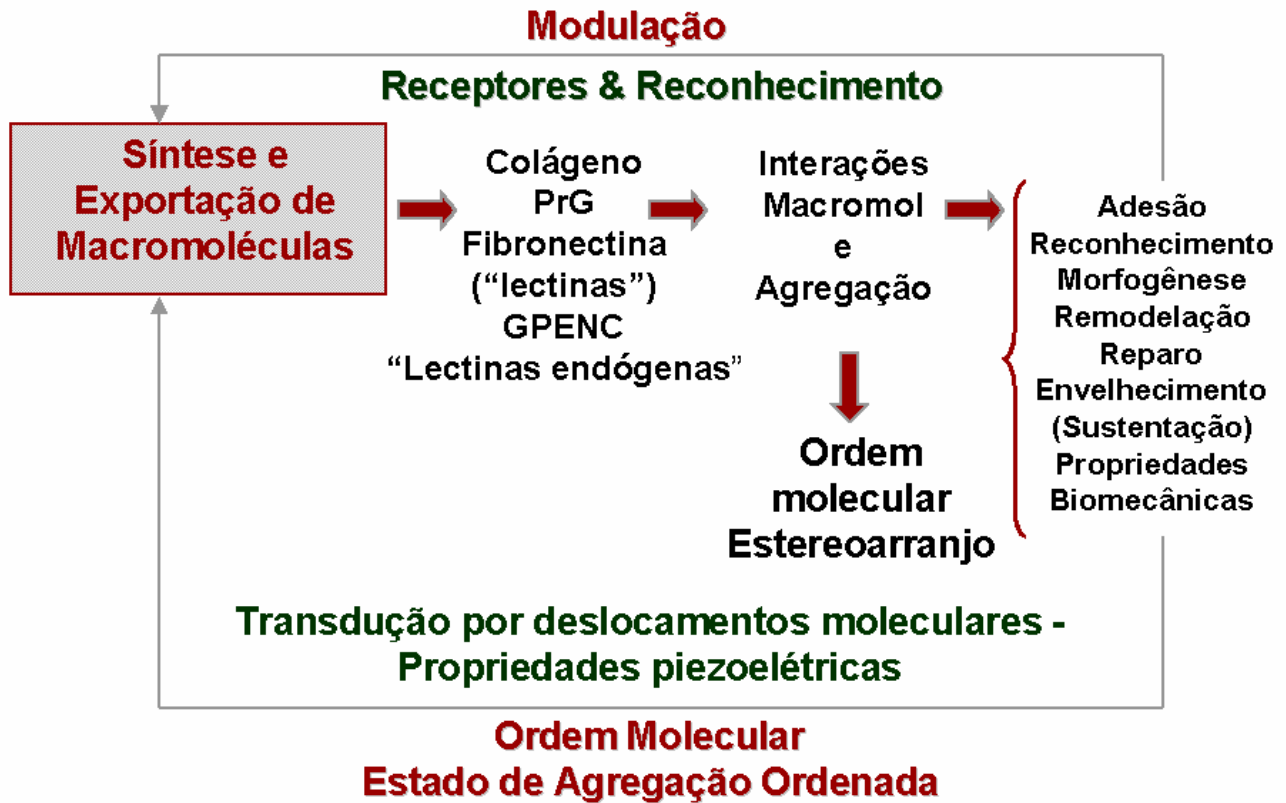
Nos vertebrados, a MEC dos tecidos conjuntivos é basicamente composta por quatro grandes classes de macromoléculas: os *colágenos*, os *proteoglicanos* (PGs), as *proteínas não-colagênicas* e as *proteínas do complexo elástico*. A qualidade e a quantidade dessas macromoléculas variam entre os diferentes tecidos conjuntivos, contribuindo para as propriedades biomecânicas das estruturas anatômicas nas quais se encontram (HAY, 1991).

Todas as macromoléculas possuem em suas superfícies “mapas químicos” ou “requerimentos estruturais” que lhes são específicos, tornando possíveis os fenômenos espontâneos de auto-reconhecimento e automontagem intra e intermoleculares (VIDAL, 1994). Dessa forma, a supra-organização de macromoléculas extracelulares em níveis hierárquicos superiores, bem como o arranjo final de uma MEC, são determinadas em parte pelos processos de auto-reconhecimento e automontagem molecular (HAY, 1991). O processo de automontagem apresenta controle cinético e temporal, podendo ser regulado por diversos tipos celulares envolvidos com a síntese de macromoléculas, v.g., fibroblastos e células musculares lisas (HAY, 1991; LEHN, 2002).

Conceitos atuais de auto-reconhecimento e automontagem molecular têm demonstrado a importância biológica desses processos que não são exclusivos da MEC, ocorrendo em praticamente todos os sistemas biológicos. Em termos evolutivos, a automontagem é a força motriz que possibilita a evolução do mundo

biológico. Devido à labilidade das interações que conectam os componentes moleculares de uma entidade supramolecular, a automontagem permite que um dado elemento feito de um tipo bem definido de componente seja selecionado a partir de um conjunto de compostos com todas as constituições possíveis, sob a pressão de fatores internos e/ou externos (LEHN, 2002).

Desde que a MEC possa ser conceituada como um sistema resultante de automontagem molecular tem sido proposto a existência de mecanismos de regulação e controle responsáveis pela sua realimentação (“feedback”). Atualmente, são conhecidas duas vias (FIG.2) pela qual o sistema MEC é realimentado: 1ª) a primeira via depende da interação dos componentes de MEC com receptores de superfície presentes em células que possuem toda maquinaria necessária para sintetizar componentes para esse sistema (fibroblastos, por exemplo); 2ª) a segunda via depende da ordem molecular resultante do fenômeno de automontagem, em especial do componente colagênico, e gera sinalização para as células por meio de deslocamentos intra e intermoleculares e piezopiroeletricidade. Em ambas as vias, a mensagem é percebida pelos setores de síntese e exportação da célula que responde ao sinal aumentando ou diminuindo a produção de macromoléculas para a MEC (VIDAL, 1994).



**FIGURA 2** – Mecanismos de regulação e controle responsáveis pela realimentação da matriz extracelular (VIDAL, 1994).

## ▣ Colágenos

Colágenos são as principais macromoléculas estruturais de uma MEC. Dentre outras funções, eles podem atuar, direta ou indiretamente, como agentes promotores de adesão e diferenciação celular, agentes quimiotáticos para macrófagos e fibroblastos, e antígenos nos processos imunológicos (LINSENMAYER, 1985). Atualmente, são conhecidos 26 tipos de colágenos (TABELA 1), cujas diferenças residem na composição de aminoácidos, nos domínios moleculares e nos diferentes arranjos estruturais (VAN DER REST & GARRONE, 1991).

**TABELA 1**

Classificação dos colágenos de vertebrados

<i>Organização dos colágenos</i>	<i>Tipos de colágenos</i>
Colágenos fibrilares	I, II, III, V e XI
Colágenos associados às fibrilas (FACIT)	IX, XII, XIV, XVI e XIX
Colágenos não-fibrilares – cadeia curta	VIII e X
Colágenos de membrana basal	IV
Colágenos de ancoragem	VII
Colágenos microfibrilares	VI
Outros colágenos	XIII, XV, XVII, XVIII, XX, XXI, XXII, XXIV, XXV e XXVI

**Fonte:** MICHELACCI, 2003.

De agora em diante, maior ênfase será dada à caracterização dos colágenos fibrilares. A molécula de colágenos fibrilares tem forma de bastão, com peso molecular em torno de 300kDa. Ela é composta por três cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias  $\alpha$ , ricas em prolina e glicina, formando uma tripla fita helicoidal (VAN DER REST & GARRONE, 1991). Sua estrutura primária contém uma seqüência repetitiva de Gly-X-Y, podendo X e Y ser qualquer aminoácido, porém freqüentemente X é prolina e Y é glicina (VAN DER REST & GARRONE, 1991). O colágeno também apresenta alanina e quantidade expressiva de hidroxiprolina, sendo que esse último aminoácido não ocorre em outras proteínas de vertebrados (REDDY *et al.*, 1998; STEHNO-BITTEL *et al.*, 1998).

A hélice do colágeno apresenta uma série de restrições estruturais que estão relacionadas ao seu conteúdo não-habitual de aminoácidos (NELSON & COX, 2002). Moléculas de colágeno são enzimaticamente glicosiladas em seus resíduos de hidroxiprolina (HAY, 1991). Seus resíduos de prolina, por sua estrutura em anel, não apresentam rotação em seu domínio N-C $\alpha$ , enquanto a rotação entre os carbonos de C $\alpha$ -C=O apresenta-se restringida. Dessa forma, esses resíduos são os principais responsáveis pela estabilidade conformacional do colágeno, lhe proporcionando, juntamente com as ligações cruzadas intermoleculares, uma resistência à tensão maior do que aquela proporcionada por um fio de aço de idêntica secção transversal (NELSON & COX, 2002).

As cadeias  $\alpha$  das moléculas de colágeno são unidas por ligações cruzadas envolvendo resíduos de lisina, hidroxilisina ou histidina. Essas ligações cruzadas

são determinadas geneticamente, e dão origem aos resíduos de aminoácidos não-primários, como a hidroxilisnonorleucina. Tanto o número de ligações cruzadas do colágeno quanto o alinhamento específico dessas ligações diferem entre os tecidos conjuntivos, produzindo bandas características em uma micrografia eletrônica (NELSON & COX, 2002).

O colágeno apresenta características mesofasogênicas, i.e., de cristal-líquido. Essas características, juntamente com a ordem molecular (cristalinidade), estabelecem as condições necessárias para que o colágeno, a exemplo de outros polímeros biológicos ou artificiais, tenha propriedades piezo-piroelétricas (ATHENSTAED, 1974; FUKADA, 1974) que geram sinalização celular, conforme mencionado anteriormente. O colágeno também possui importantes propriedades ópticas anisotrópicas, denominadas birrefringência e dicroísmo linear, que permitem seu estudo sob luz polarizada (VIDAL, 1964).

(1) A Birrefringência é a anisotropia devida à diferença de índices de refração do colágeno, o que significa propagação de luz com velocidades e direções diferentes. Dois tipos de birrefringência podem ser detectados nas fibras de colágeno: a birrefringência intrínseca e a birrefringência de forma ou textural (VIDAL, 1964).

Birrefringência intrínseca: deve-se a transições de elétrons nas ligações peptídicas planares (FIG.3) situadas ao longo do eixo das fibras de colágeno (VIDAL, 1964). Dessa forma, birrefringência intrínseca é uma consequência da

diferença no caminho óptico ou no retardo óptico da luz (RO) (ORIELL & SCHELLMAN, 1966):

$$RO = S \times e^2 / 2\varepsilon_0 m \omega_0^2$$

onde:

$\underline{S}$  é o número de ligações peptídicas/cm<sup>2</sup>;  $\underline{e}$  e  $\underline{m}$  são a carga e a massa do elétron, respectivamente;  $\underline{\varepsilon}_0$  é a permissividade do espaço (constante dielétrica);  $\underline{\omega}_0$  é a frequência de ressonância do elétron (ORIELL & SCHELLMAN, 1966).

Birrefringência textural ou de forma: resulta da compatibilidade dos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) do fóton com as dimensões nanométricas da molécula de colágeno, e também da sua concentração molecular, estado de agregação e organização espacial 3D. As informações sobre a birrefringência de forma de um corpo anisotrópico são obtidas por medidas acuradas de RO efetuadas em meios de embebição com índices crescentes de refração (VIDAL, 1964).

Para expressar a birrefringência de forma de corpos birrefringentes positivos, WIENER (1912) propôs a seguinte equação (*apud* VIDAL, 1987):

$$n_e^2 - n_o^2 = \frac{S_1 S_2 (n_1^2 + n_2^2)^2}{(1 + S_1) n_2^2 + S_2 n_1^2}$$

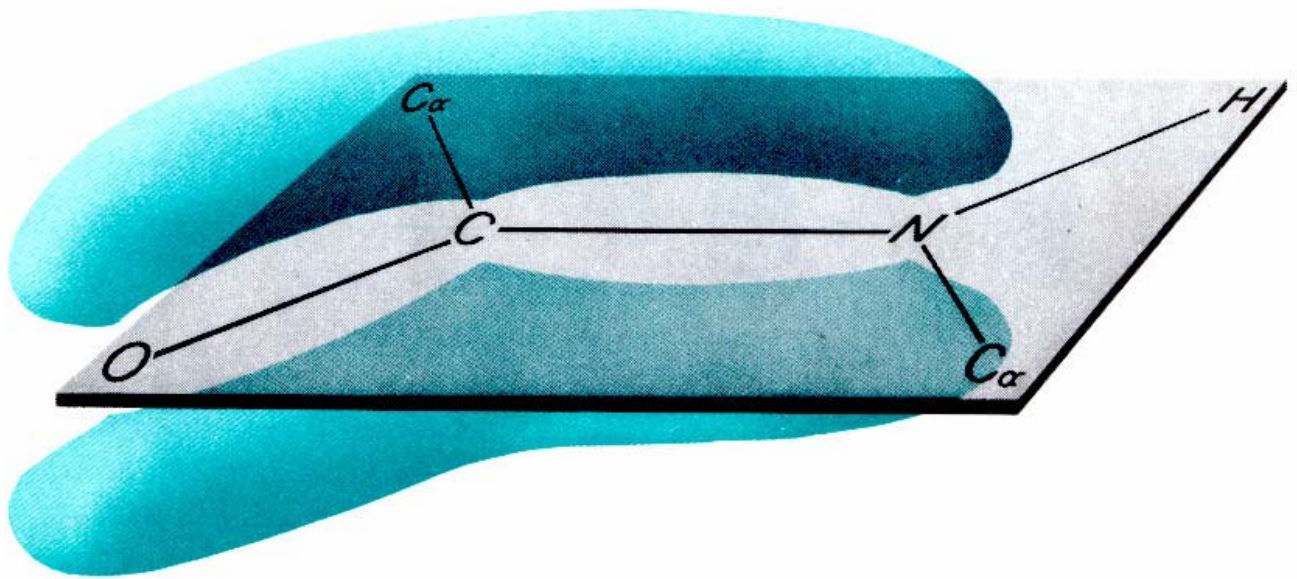
onde:

$\underline{n}_1$  é índice de refração das micelas que compõem o corpo;  $\underline{n}_2$  é índice de refração do meio de embebição;  $\underline{S}_1$  e  $\underline{S}_2$  são volumes parciais dos componentes com os índices de refração  $\underline{n}_1$  e  $\underline{n}_2$ , respectivamente, de tal modo que:  $\underline{S}_1 + \underline{S}_2 = 1$ ;



$n_e^2 - n_o^2$  é a constante elétrica para uma dada frequência. Contudo, a equação de WIENER, não é aplicável as fibras/feixes de colágeno, pois não fornece as variações da birrefringência intrínseca como uma função do solvente, superestimando a contribuição textural (TAYLOR & CRAMER, 1963; CASSIM & TAYLOR, 1965; ORIEL & SCHELLMAN, 1966; CASSIM & TOBIAS, 1968; NORDÉN, 1978). Os feixes de colágeno não apresentam um único índice de refração  $n_l$  nem um único volume relativo  $S_l$  devido à sua complexidade em composição e interações moleculares. Assim, os procedimentos experimentais seriam mais indicados para expressar a birrefringência de forma do colágeno.

(2) O dicroísmo linear manifesta-se em corpos que absorvem a luz polarizada diferentemente na dependência da direção de seu grupo cromofórico em relação ao azimute do vetor elétrico. Quando a luz polarizada incide sobre a região cromofórica da molécula, cujos elétrons estejam vibrando em um plano que coincida com o azimute do vetor elétrico ocorre um máximo de absorção da luz polarizada. As estruturas biológicas, geralmente, são desprovidas de grupos cromofóricos que apresentem dicroísmo linear detectável em espectro visível, sendo que o colágeno exibe dicroísmo linear somente em luz ultravioleta (190-200 nm), devido às mesmas ligações peptídicas planares (transições eletrônicas) que respondem pela birrefringência intrínseca. Dessa forma, são observados fenômenos de dicroísmo linear extrínsecos, de maneira similar ao que ocorre em fenômenos de dicroísmo circular extrínsecos (VIDAL, 1984).



**FIGURA 3** – Ligação peptídica planar situada ao longo do eixo longitudinal das fibras de colágeno, cujas transições eletrônicas respondem pela birrefringência intrínseca (DICKERSON & GEIS, 1969).

## ▣ *Proteoglicanos*

Proteoglicanos (PGs) são glicoconjugados macromoleculares complexos que contêm um core protéico covalentemente ligado a uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs). Eles também podem apresentar em sua estrutura, oligossacarídeos dos tipos N- e/ou O-ligados (SWEET *et al.*, 1977; LOHMANDER *et al.*, 1980).

Nos espaços intercelulares existem duas classes principais de PGs: os grandes, representados pelo agregam e versicam; e os pequenos PGs, onde destacam-se o decorim, biglicam, fibromodulim, lumicam, epificam, queratocam e a osteoglicina (KUC & SCOTT, 1997; CHAKRAVARTI *et al.*, 1998).

Do ponto de vista funcional, PGs são macromoléculas extremamente versáteis podendo desempenhar inúmeras funções estruturais nos tecidos conjuntivos. Essa versatilidade dos PGs reside em diferenças no esqueleto protéico, e nas classes, quantidades, comprimentos e padrões de sulfatação das suas cadeias de GAGs (HASCALL & HASCALL, 1985). Frequentemente, a porção formada pelo glicosaminoglicano corresponde a maior fração (em massa) das moléculas de PGs, sendo o principal sítio de atividade biológica. Em muitos casos, a atividade biológica dos PGs resulta de múltiplos sítios de ligação, ricos em possibilidades de realizar pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas com outras proteínas da MEC (NELSON & COX, 2002).

Os GAGs são heteropolissacarídeos lineares constituídos por unidades dissacarídicas repetidas contendo sempre uma hexosamina (D-glucosamina ou D-

galactosamina) e um açúcar não-nitrogenado que pode ser um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico) ou um açúcar neutro (D-galactose) (HASCALL & HASCALL, 1985).

Alguns GAGs possuem uma ou mais hidroxilas de seu açúcar aminado esterificadas com sulfato, e isso juntamente com os grupamentos carboxila das unidades dissacarídicas, confere aos GAGs uma alta densidade de cargas negativas (NELSON & COX, 2002). Tais cargas se associam a uma elevada quantidade de cátions livres retendo água nos tecidos, de modo a responder por grande parte das características funcionais atribuídas aos PGs (HAY, 1991). É o padrão característico das unidades sulfatadas e não-sulfatadas dos GAGs que estabelece um reconhecimento específico por uma grande variedade de proteínas ligantes, as quais eles podem se associar (NELSON & COX, 2002).

Para estudos de orientação de GAGs e disponibilidade de seus grupamentos aniônicos nos tecidos conjuntivos, a utilização de material corado com azul de toluidina (AT) pH 4.0 tem sido amplamente recomendada (VIDAL, 1964, 1972).

O AT é um corante tiazínico dotado de propriedades ópticas (dicroísmo linear e dispersão anômala da birrefringência) que têm sido amplamente estudadas por inúmeros autores (BERGERON & SINGER, 1958; LISON, 1960; VIDAL, 1963; TOEPFER, 1970; MELLO & VIDAL, 1984). A molécula de AT é privilegiada para estudos de orientação molecular porque é pequena (podendo assim intercalar-se entre outras moléculas), apresenta geometria planar e elétrons ressonando ao longo do seu eixo (VIDAL, 1963; MELLO & VIDAL, 1973). A ligação eletrostática da

molécula de AT aos substratos aniônicos é caracterizada pelas reações de basofilia e metacromasia, obedecendo aos princípios atuais da química supramolecular (VIDAL, 1987).

A metacromasia, no caso do AT, é um efeito espectral caracterizado pelo abaixamento do pico original de absorção da luz, até muitas vezes o seu desaparecimento (hipocromismo), simultaneamente ao deslocamento dos maiores valores de absorbância para comprimentos de onda mais curtos (hipsocromismo). Uma das causas apontadas para a manifestação da metacromasia é a formação de dímeros, trímeros e tetrâmeros por empilhamento das moléculas do corante (LISON, 1960). Esse empilhamento ordenado pode ocorrer espontaneamente em solução ou ser induzido por um biopolímero ácido (VIDAL, 1963, 1977, 1980).

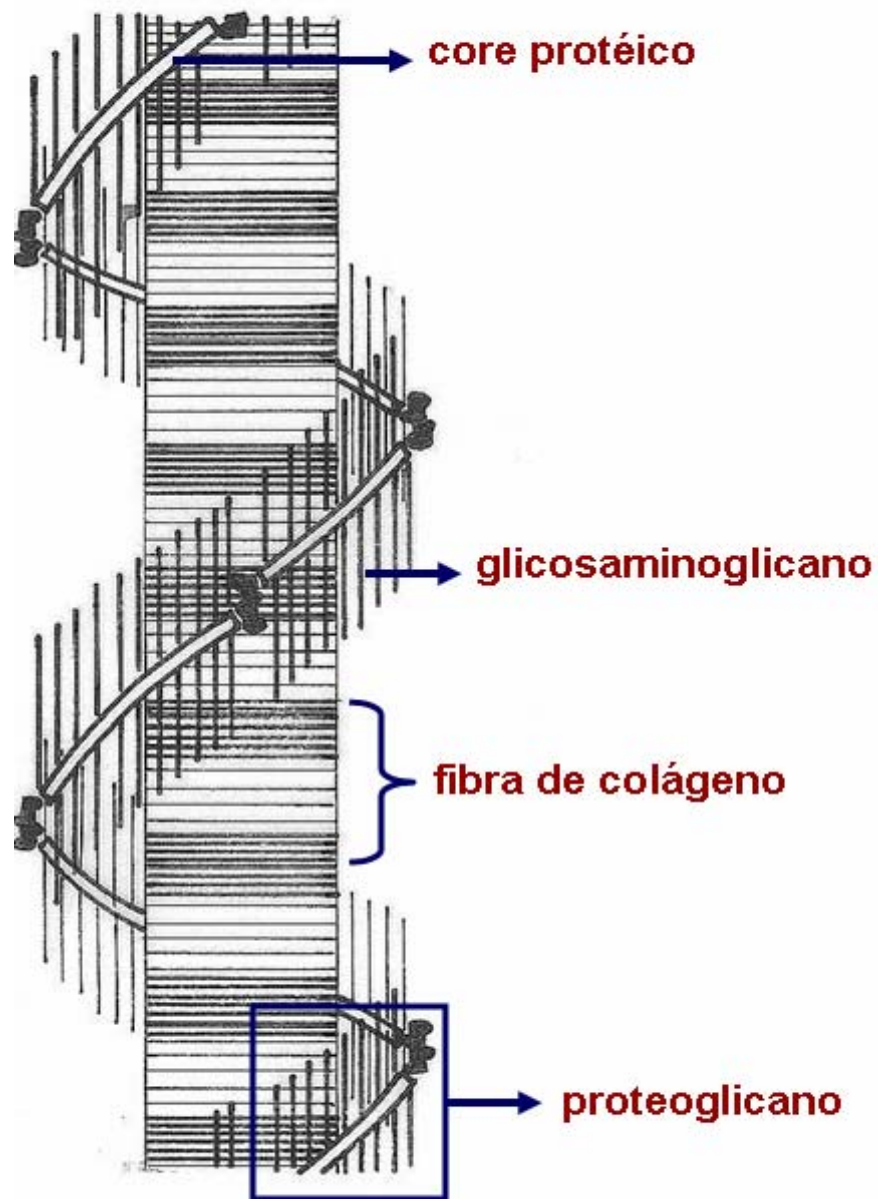
Na MEC, o AT se liga ordenadamente aos grupos aniônicos dos GAGs, sendo que seus eixos mais longos orientam-se perpendicularmente ao maior eixo da molécula de colágeno (LISON, 1960; MELLO & VIDAL, 1973; SILBERMAN & FROMER, 1973). Baseando-se nessa última observação e nas propriedades ópticas anisotrópicas das fibras de colágeno, VIDAL (1963) propôs que os GAGs dos PGs estão estatisticamente alinhados paralelamente ao eixo longitudinal das fibrilas de colágeno, e também a cadeia polipeptídica do esqueleto protéico dos PGs pode assumir uma conformação helical com respeito às fibrilas (FIG.4). Além do modelo de interação proposto por VIDAL, atualmente estão descritos inúmeros outros modelos de interação PGs-fibrilas de colágeno. Em todos os modelos, os autores propõem que os PGs são ordenados em relação as fibrilas de colágeno, porém

discordam quanto a orientação espacial das suas cadeias de GAGs e do esqueleto protéico em relação ao longo eixo das fibrilas de colágeno (MATHEWS 1965; JACKSON & BENTLEY 1968; SCOTT 1995; MÜLLER *et al.*, 2004). Provavelmente, essa discordância deve-se a diferenças de interpretação dos dados e, talvez, ao fato de alguns autores não considerarem ou conhecerem profundamente a base física da metodologia utilizada.

### ▣ *Proteínas não-colagênicas*

Além dos colágenos e PGs, a MEC contém diversas proteínas não-colagênicas, dentre as quais destacam-se a laminina e a fibronectina (COMPER, 1996). A laminina é um componente de lâmina basal que atua como mediadora da adesão celular com outros componentes de MEC. Já as fibronectinas são abundantes na MEC dos tecidos conjuntivos, nas membranas basais e nos fluídos corporais (PIEZ & REDDI, 1984). Fibronectinas são sintetizadas por fibroblastos, células endoteliais, condrócitos, células gliais e miócitos, contribuindo significativamente para processos de migração e diferenciação celular, coagulação sanguínea, formação de metástases, além do desenvolvimento embrionário.

Mais recentemente, outras proteínas não-colagênicas foram identificadas, dentre elas as proteínas oligoméricas de matriz de cartilagem e as proteínas de 58 e 36kDa (HEDBOM *et al.*, 1992; HEINEGARD & PIMENTEL, 1992).



**FIGURA 4** – Modelo de interação entre fibras de colágeno e PGs, conforme proposto por VIDAL (1987). Segundo esse modelo, os GAGs dos PGs estão alinhados paralelamente ao eixo longitudinal das fibrilas, e também a cadeia polipeptídica do core protéico dos PGs pode assumir uma conformação helicoidal com respeito às fibrilas de colágeno.

## ▣ *Proteínas do complexo elástico*

As principais proteínas do complexo elástico são a elastina e as fibrilinas. Elas são encontradas como componentes das lâminas e fibras elásticas e das fibras elaunínicas e oxitalânicas (COTTA-PEREIRA *et al.*, 1976, 1984).

A elastina, ao contrário das demais proteínas de MEC, não sofre glicosilação durante sua biossíntese. Ela apresenta em sua estrutura aminoácidos contendo resíduos de glicina e alanina, e com riqueza em prolina e valina. Sua seqüência primária, apresenta como característica principal a alternância de resíduos de lisina e alanina em seqüências do tipo  $lys^1-ala^2-ala^3-lys^4$  e  $lys^1-ala^2-ala^3-ala^4-lys^5$ . Esse tipo de alternância permite que segmentos de elastina se organizem em  $\alpha$ -hélice contendo lisina em cada uma de suas extremidades e do mesmo lado da hélice, possibilitando assim a formação de ligações cruzadas intra e intercadeias. Os segmentos em  $\alpha$ -hélice fazem conexão com segmentos hidrofóbicos capazes de se distenderem e exporem seus aminoácidos ao meio aquoso toda vez que uma força de deformação é aplicada. Quando a força de deformação cessa, os aminoácidos dos segmentos hidrofóbicos tendem a espontaneamente se re-agruparem, retornando a uma condição termodinamicamente mais favorável, i.e., a conformação inicial observada em repouso (PIMENTEL & CARVALHO, 2003).

A associação das moléculas de elastina para formação de fibras e lâminas elásticas depende da existência de um arcabouço de microfibrilas, dentre elas a fibrilina. Entretanto, parece que a estrutura final de uma fibra elástica também



apresenta controle celular, uma vez que numerosos prolongamentos citoplasmáticos podem ser observados contornando as fibras elásticas durante seu processo de maturação (PIMENTEL & CARVALHO, 2003).

Fibras elásticas podem interagir com outras macromoléculas da MEC contribuindo para a biomecânica tecidual e estrutural. Bons exemplos de estruturas, cuja biomecânica é determinada, em parte, pelos componentes do sistema elástico, são as artérias elásticas de mamíferos, o pescoço de boi e os tendões elásticos de aves (MECHAN & HEUSER, 1991; KREIS & VALE, 1999). Nas artérias elásticas, os domínios hidrofóbicos das moléculas de elastina, contribuem junto com o colágeno, para a distensão da parede arterial durante a sístole e o seu relaxamento durante a diástole cardíaca. Já em tendões elásticos de frangos, as fibras elásticas alongam-se toda vez que o tendão é distendido por forças tensionais, possibilitando que as fibras colágenas (inicialmente onduladas) se alinhem com o eixo do tendão de modo a resistir às forças de deformação. Igualmente, quando as forças tensionais cessam, as fibras elásticas retornam ao estado retraído, fazendo com que as fibras colágenas retornem ao estado inicial, i.e., ondulado (PIMENTEL & CARVALHO, 2003).

Embora, seja possível encontrar na literatura muitos métodos para descrição morfológica e topográfica das fibras elásticas, seus mecanismos de especificidade ainda não são totalmente conhecidos. Dentre esses métodos destacam-se aqueles que utilizam sondas fluorescentes como o 1-anilino-8-sulfato de naftaleno (ANS) e o cloreto de danzila (BRAGA-VILELA & VIDAL, 2006).

ANS e cloreto de danzila têm sido amplamente usados para estudos de polaridade, hidrofobicidade, reatividade e conformação molecular de proteínas (STRYER, 1965; RADDI, 1973). A coloração com ANS tem sido descrita como um método destinado à detecção de sítios moleculares não-polares, desde que esses sítios sejam extensos e estericamente disponíveis para ligação ao corante (STRYER, 1965). O ANS tem sido usado para detecção do grau de agregação em histonas, para avaliação de alterações estruturais em elastina, em histoquímica para identificação de elastina e colágeno, e mais recentemente, em biossensores destinados à detecção de hemoglobinas glicosiladas (LAURENCE, 1966; GOSLINE, 1976; VIDAL, 1978). Já o cloreto de danzila tem sido utilizado para o estudo estrutural de inúmeras moléculas e para a análise quantitativa de aminas primárias, secundárias e terciárias (BARTZATT, 2003); isso porque, a solução de cloreto de danzila é específica para demonstração microfluorométrica de  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> e  $\epsilon$ -NH<sub>3</sub> (ROSSELET & RUCH, 1968). Em aminoácidos ligados a proteínas, o cloreto de danzila liga-se a amina livre da lisina. Em estruturas ricas em tecido conjuntivo, a coloração com cloreto de danzila tem sido usada como um método fluorescente para identificação de elastina e colágeno (TIMBERLAKE *et al.*, 2002).

## **CÓRNEA**

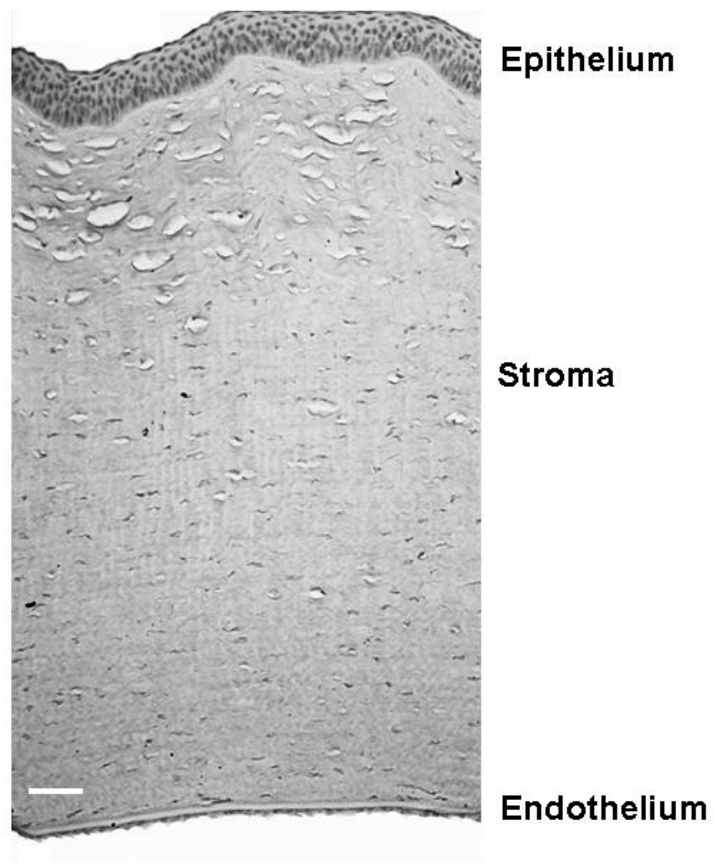
A córnea é uma estrutura anesférica (curvada), transparente e avascular, que juntamente com a esclera, constitui a túnica fibrosa externa dos olhos

(MAURICE, 1957, 1984; MICHELLACCI, 2003; MARTINS, 2005). Limitando a córnea e a esclera há uma região de transição denominada limbo esclerocorneal (KLYCE & BEUERMAN, 1988). Em termos de funcionalidade, a córnea atua como uma lente convergente responsável, em humanos, por 70% do poder dióptrico dos olhos. Além disso, ela responde pela manutenção da forma do olho e protege as demais estruturas oculares devido à sua alta resistência a forças mecânicas (WARING III, 1984; KLYCE & BEUERMAN, 1988).

Histologicamente, a córnea é constituída por um estroma central delimitado anteriormente por um epitélio estratificado pavimentoso e, posteriormente, por um endotélio que repousa sobre uma membrana basal denominada membrana de Descemet (FIG. 5) (KLYCE & BEUERMAN, 1988; MARTINS, 2005). Em humanos, primatas superiores, grandes herbívoros e aves, o epitélio repousa sobre uma membrana espessa denominada camada de Bowman (KLYCE & BEUERMAN, 1988). Nos demais vertebrados, a camada de Bowman está ausente e o epitélio repousa sobre uma lâmina basal similar aquelas observadas em epitélios de revestimento de outras estruturas (MARTINS, 2005).

O estroma representa aproximadamente 90% da espessura corneal (JARONSKI & KASPRZAK, 2003) e corresponde a uma MEC altamente especializada, cujas principais macromoléculas são os colágenos fibrilares (ROBERT *et al.*, 2001; MICHELLACCI, 2003; INHANAMAKI *et al.*, 2004).

O colágeno predominante no estroma corneal é o tipo I (ROBERT *et al.*, 2001; MICHELLACCI, 2003), mas também colágenos V (LEE & DAVISON, 1984) e VI são encontrados em quantidades relativamente altas (ZIMMERMANN *et al.*, 1986).



**FIGURA 5** – Micrografia de córnea porcina. Barra = 65  $\mu\text{m}$

Aparentemente, as moléculas de colágeno I são incorporadas ao colágeno V formando fibrilas heterotípicas com periodicidade de 65 nm (BIRK *et al.*, 1988; MALIK *et al.*, 1992). Já o colágeno tipo VI forma estruturas microfibrilares por agregação lateral (MICHELLACCI, 2003). Também os colágenos tipo III, XII, XIII e XIV estão presentes no estroma da córnea, porém em pequenas proporções (MICHELLACCI, 2003). Vários estudos têm demonstrado que colágenos XII e XIV são colágenos FACIT que podem interagir com inúmeras proteínas estromais, auxiliando na regulação da estrutura e do funcionamento dos colágenos fibrilares. Colágeno XIII é um colágeno não-fibrilar que tem sido encontrado em 2/3 do estroma posterior da córnea (SANDBERG-LALL *et al.*, 2000).

Os colágenos fibrilares do estroma corneal originam fibras com espaçamento lateral regular e diâmetro uniformemente pequeno (aproximadamente 31 nm) quando comparadas às fibras presentes em outras estruturas (MICHELLACCI, 2003; DOUGHTY & BERGMANSON, 2004). Inúmeros estudos têm reportado que o espaçamento e diâmetro das fibras de colágeno, juntamente com os baixos níveis de hidratação e os PGs estromais (Lumicam, Decorim, Mimecam e Queratocam) constituem a base física da transparência e biomecânica corneal (MAURICE, 1957; GOLDMAN *et al.*, 1968; QUANTOCK *et al.*, 1990; FARREL, 1994; CHAKRAVARTI *et al.*, 1998).

Centenas de camadas de fibras colágenas com espessura variável entre 1.5 e 2.5  $\mu\text{m}$  se reúnem (auto-reconhecimento e automontagem molecular), formando as chamadas lamelas estromais (JARONSKI & KASPRZAK, 2003; LOUIS-

DORR *et al.*, 2004). Em geral, córneas normais (sadias) possuem aproximadamente 300 lamelas na região mais central do estroma e 500 lamelas na região do limbo (JARONSKI & KASPRZAK, 2003).

Em cada lamela, as fibras de colágeno são estabilizadas por PGs e orientadas paralelamente umas as outras, porém formando diferentes ângulos com fibras localizadas em lamelas adjacentes (MAURICE, 1984; FARREL *et al.*, 1999; KOMAI & USHIKI, 1991; MEEK & FULWOOD, 2001).

Assim como fibras colágenas, as lamelas também possuem direções preferenciais de orientação no estroma, em relação aos eixos anatômicos (súpero-inferior e têmporo-nasal) da córnea. Para a maioria dos animais, incluindo humanos e camundongos, admite-se que no centro da córnea 60% das lamelas se orientam preferencialmente nas direções súpero-inferior e têmporo-nasal, enquanto 40% das lamelas estariam orientadas obliquamente (DAXER & FRATZL, 1997; NEWTON & MEEK, 1998; BOOTE *et al.*, 2004).

O arranjo lamelar e a distribuição espacial das fibras colágenas (arquitetura estromal) conferem à córnea importantes propriedades ópticas anisotrópicas que há muito tempo têm sido reconhecidas como fundamentais para sua eficiência refrativa (MAURICE, 1984; JARONSKI & KASPRZAK, 2003; LOUIS-DORR *et al.*, 2004). Essas propriedades são referidas como birrefringência e dicroísmo linear.

No estroma da córnea, dois tipos de birrefringências podem ser detectados: (1) a birrefringência intrínseca, que segundo muitos autores, tem origem em cada fibra colágena individual dentro das lamelas e (2) a birrefringência de forma, cuja

origem seria a orientação espacial das lamelas estromais (JARONSKI & KASPRZAK, 2003).

Na literatura encontram-se registrados dois modelos que descrevem a birrefringência de forma corneal. O primeiro modelo propõe que a córnea deve ser tratada como um cristal uniaxial com seu eixo óptico perpendicular a sua superfície (STANWORTH & NAYLOR, 1950). Já o segundo modelo propõe que a córnea comporta-se como um cristal biaxial com a bisetriz dos seus dois eixos ópticos perpendiculares à sua superfície (VAN BLOKLAND & VERHELST, 1987). Os mesmos autores que propuseram este segundo modelo descreveram que, na área central do plano da pupila, os valores de retardo óptico da birrefringência de forma corneal são constantes, porém aumentam gradativamente em direção às áreas periféricas do plano da pupila (VAN BLOKLAND & VERHELST, 1987).

A outra forma de anisotropia corneal, ou seja, o dicroísmo deve-se ao arranjo estrutural das fibras colágenas ( $n_D = 1.52$ ) no material protéico ( $n_D = 1.34$ ) da MEC (JARONSKI & KASPRZAK, 2003). Estudos recentes usando espectrofotometria associada à matriz de Müeler (um modelo matemático 4X4) têm demonstrado que, na córnea normal, o dicroísmo linear é fraco e/ou negativo quando os valores dos ângulos de incidência dos feixes de luz na superfície corneal são pequenos, porém torna-se positivo à medida que o ângulo de incidência aumenta (JARONSKI & KASPRZAK, 2003). Esta mudança de sinal sugere que a córnea se comporte como um cristal biaxial e, portanto, o modelo de

birrefringência de forma segundo VAN BLOKLAND & VERHELST (1987) seria o mais adequado para descrever essa estrutura.

Desde a descoberta das anisotropias ópticas corneais, muitos pesquisadores têm utilizado luz polarizada como ferramenta para investigar a microestrutura e as propriedades ópticas da córnea. Entretanto, o uso de luz polarizada requer certos conhecimentos sobre as propriedades ópticas e biomecânicas da estrutura ocular e sobre o processo físico que ocorre quando a luz polarizada propaga-se através dela. Nos últimos anos, o emprego de luz polarizada para investigação da córnea tem auxiliado na compreensão e no diagnóstico de várias doenças (NEWTON *et al.*, 1998; MARTINS, 2005). Atualmente, a luz polarizada tem sido utilizada para monitoramento dos níveis de glicose ocular em pacientes diabéticos (WAN *et al.*, 2005).

Durante o *diabetes*, as fibras colágenas do estroma corneal ficam expostas a uma série de alterações, sendo que a mais comum é a glicosilação não-enzimática dos resíduos de lisina e hidroxilisina da molécula de colágeno (MALIK *et al.*, 1992). Há indícios de que a glicosilação não-enzimática ocorra preferencialmente na região de intervalo (“gap”) da fibra de colágeno. Esta área estaria mais acessível à glicose em relação às outras regiões da fibra (WESS *et al.*, 1993). Em tendões foi demonstrado que as propriedades do colágeno, após glicosilação não-enzimática, são afetadas em diferentes aspectos tais como na habilidade para formar agregados supramoleculares (BAILEY *et al.*, 1998), na susceptibilidade à degradação térmica (HEDGE *et al.*, 2002), na autofluorescência (ANDREASSEN *et al.*, 1988), na mecanotransdução (RITTIE *et al.*, 1999) e nas



anisotropias ópticas (ALDROVANI *et al.*, 2006). *Diabetes* e aumento nos níveis de glicosilação podem acarretar deficiências de acuidade visual, desde que na córnea a função refrativa depende primariamente das propriedades ópticas das fibras colágenas. Foi demonstrado que aumento nos níveis de glicosilação diminui o diâmetro das fibras de colágeno da córnea, causando opacificação corneal (CHAKRAVARTI *et al.*, 1998).

## **AORTA**

A aorta é uma artéria elástica, cujas principais proteínas de MEC são a elastina e os colágenos I e III, respectivamente (REDDY, 2004). Este tipo de artéria se caracteriza por apresentar uma túnica íntima muito espessa, devido ao grande desenvolvimento da camada subendotelial, rica em fibras elásticas, quando comparada com a camada subendotelial de outros vasos sanguíneos. Suas lâminas elásticas interna e externa não são evidentes, pois se confundem com as membranas da túnica média (BERGEL, 1961; ATTINGER, 1964; MILCH, 1965). A túnica ou camada média é formada por numerosas lâminas elásticas perfuradas, dispostas concentricamente e intercaladas por pequenos espaçamentos que contêm células musculares lisas, PGs, glicoproteínas e fibras espessas formadas pela associação dos colágenos I e III (BERGEL, 1961; ATTINGER, 1964; MILCH, 1965). Por fim, a túnica adventícia, camada mais externa da parede vascular, é

pouco desenvolvida nas artérias elásticas (BERGEL, 1961; ATTINGER, 1964; MILCH, 1965).

Chama a atenção, na aorta, o fato de seus dois componentes principais – elastina e colágeno – serem proteínas de longa atividade biológica, cujos conteúdos totais presentes na parede do vaso variam ao longo do trajeto arterial (MILCH, 1965). De modo geral, a aorta apresenta em sua porção supra-diafragmática, em especial próximo ao coração, maior conteúdo de elastina e colágeno do que em sua porção infra-diafragmática. No entanto, apesar dessa variação, a elastina sempre predomina na túnica média ao longo de todo trajeto arterial (MILCH, 1965).

Do ponto de vista funcional, lâminas elásticas e fibras colágenas, juntamente com as células musculares lisas, formam o sistema mioestromal ou miofibroso que contribui para a viscoelasticidade e biomecânica do caminho arterial, auxiliando na regulação do fluxo sanguíneo (RHODIN, 1980; STEHBENS, 1996). Além disso, lâminas elásticas e fibras colágenas arteriais são responsáveis pelo tônus e, em parte, pela contratibilidade das células musculares lisas (CLARK & GLAGOV, 1985; DINGEMANS *et al.*, 1981).

Devido à aorta estar em íntimo contato com o sangue, elastina e colágeno arterial estão sujeitas a uma série de alterações provocadas por processos biológicos, uso prolongado de medicamentos e/ou doenças. Assim sendo, a hiperglicemia pode rapidamente influir negativamente no metabolismo arterial (REDDY, 2004). Atualmente, há um consenso que anormalidades bioquímicas

induzidas pela hiperglicemia, tais como glicosilação não-enzimática de proteínas, ativação da via poliol e atividade alterada de proteína kinase C podem prejudicar o fluxo sanguíneo e a função hemodinâmica (MASSI-BENEDETTI & FEDERICI, 1999; KASUYA *et al.*, 1999; RUEF *et al.*, 2000; CERAMI *et al.* 1985; BUCALA & VLASSARA, 1995; BERG *et al.*, 1997; ROSS, 1999; HIGASHI *et al.*, 1997). Também há evidências de que a hiperglicemia causa deposição de placas ateroscleróticas na via vascular, podendo induzir infarto do miocárdio (REDDY, 2004; AHMED, 2005).

Análises bioquímicas do colágeno aórtico de ratos diabéticos indicaram aumento no conteúdo, na resistência à solubilidade e na distribuição deste quando comparado ao controle (REDDY, 2004). Além disso, vários estudos têm demonstrado que tanto o colágeno quanto a elastina de aortas humanas e murinas, após glicosilação *in vitro*, são capazes de acumular AGEs que causam endurecimento e perda de flexibilidade arterial (TOMIZAWA *et al.*, 1993; BRÜEL & OXLUND, 1996; BAYDANOFF *et al.*, 1996).

## **JUSTIFICATIVA & OBJETIVOS**

---

Diante das numerosas evidências que a glicosilação não-enzimática de proteínas extracelulares contribui efetivamente para a patogenia das complicações diabéticas secundárias, estruturas ricas em tecido conjuntivo e cuja biomecânica está diretamente relacionada à organização supramolecular, ao arranjo tridimensional e/ou ao conteúdo (qualidade e quantidade) de uma ou mais proteínas de MEC podem ter seu metabolismo gravemente afetado pela doença. Dentre estas estruturas, nós elegemos as oculares e vasculares como merecedoras de um estudo aprofundado devido à freqüência na qual elas são acometidas por modificações severas em *diabetes* e ao impacto negativo que isso causa na qualidade e/ou expectativa de vida de indivíduos portadores da doença.

#### **Objetivo Geral:**

Com base na justificativa exposta, o objetivo do presente estudo foi investigar os possíveis efeitos da glicosilação não-enzimática sobre a organização supramolecular, orientação espacial e propriedades ópticas de proteínas extracelulares da córnea e da aorta de camundongos diabéticos não-obesos (NOD).

#### **Objetivos Específicos:**

1. Investigar valores de retardo óptico associados com birrefringência intrínseca (cristalinidade) e birrefringência de forma (empacotamento molecular) em fibras colágenas do estroma da córnea de camundongos diabéticos (NOD/Uni)

e não-diabéticos (BALB/c/Uni). Investigar a contribuição dos proteoglicanos para as anisotropias ópticas do estroma corneal;

2. Determinar a capacidade do *diabetes*, por meio da formação de produtos de glicosilação, induzir alterações moleculares e estruturais em lâminas elásticas e fibras colágenas da aorta abdominal de camundongos NOD/Uni. Investigar a ocorrência de proliferação das células musculares lisas nas aortas de camundongos NOD/Uni;

3. Verificar se os corantes fluorescentes anilino-sulfato de naftaleno (ANS) e cloreto de danzila são capazes de detectar alterações provocadas pelo *diabetes* em lâminas elásticas e fibras colágenas de camundongos NOD/Uni;

4. Verificar se a reação de Feulgen oferece fluorescência adequada para análises nucleares envolvendo microscopia confocal.

## REFERÊNCIAS

---

- AHMED, N., 2005. Advanced glycation endproducts – role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Practice*, 67: 3-21.
- ALDROVANI, M., MELLO, M.L.S., GUARALDO, A.M.A. & VIDAL, B.C., 2006. Molecular order and ordered aggregational state in tendon collagen bundles of NOD mice. Submetido para publicação.
- ANDREASSEN, T.T., OXLUND, H., DANIELSEN, C.C., 1988. The influence of non-enzymatic glycosylation and formation of fluorescent reaction products on the mechanical properties of rat tail tendons. *Conn. Tissue Res.*, 17:1-9.
- ARDUÍNO, J., 1962. Diabetes mellitus. Cap. 1. Diabetes mellitus.
- ATHENSTAED, H., 1974. Pyroelectric and piezoelectric properties of vertebrates. *Ann. NY Acad. Sci.*, 238:68-94.
- ATTINGER, E.O., 1964. The cardiovascular system. In: *Pulsatile Blood Flow*, edited by E.O. Attinger. Blakiston Division, New York, pp. 1-14.
- BAILEY, A.J., PAUL, R.G. & KNOTT, L., 1998. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. In: *Mechan. Ageing and Develop.*, 106: 1-2:1-56.
- BARTZATT, R., 2003. Dansylation of aromatic, aliphatic, and medical carboxylic acid compounds in 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer. *Analyt. Chim. Acta*, 488:203-209.
- BAYDANOFFY, S., KONOVA, E. & IVANOVA, N., Determination of anti-AGE antibodies in huma serum. *Glycoconjug. J.*, 13:335-339.
- BERG, T.J., BANGSTED, H.J., TORJESEN, P.A., OSTERBY, R., BUCALA, R. & HANSEN, K.F. 1997. Advanced glycation end-products in serum predict changes in the kidney morphology of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 46:661-665.



- BERGEL, D.H., 1961. The static elastic properties of the arterial wall. *J. Physiol.*, 156, 445.
- BERGERON, J.A. & SINGER, M., 1958. Metachromasy: an experimental and theoretical reevaluation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4:433-457.
- BIRK, D.E., FITCHL, J.M., BASBIARZ, J.P. & LINSENMAYER, T.F., 1988. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J. Cell. Biol.*, 106: 999-1008.
- BISHARA, N.B., DUNLOP, M.E., MURPHY, T.V., DARBY, I.A., RAJANAYAGAM, M.A.S. & HILL, M.A., 2002. Matrix protein glycation impairs agonist-induced intracellular  $Ca^{++}$  signaling in endothelial cells. *J. Cell. Physiol.*, 198:80–92.
- BOOTE, C., DENNIS, S. & MEEK, K., 2004. Spating mapping of collagen fibril organization in primate cornea – an X-ray diffraction investigation. *J. Struct. Biol.*, 146:359-367.
- BRAGA-VILELA, A.S. & VIDAL, B.C., 2006. Identification of elastic fibers and lamellae in porcine pericardium and aorta by confocal, fluorescence and polarized light microscopy. *Acta Histochem.*, 108(2):125-132.
- BROWNLEE, M., CERAMI, A. & VLASSARA, H., 1988. Advanced glycosylation endproducts in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N. Eng. Med.*, 318:1315-1321.
- BRUEL, A. & OXUND, H., 1996. Changes in biomechanical properties, composition of collagen and elastin, and advanced glycation end products of the rat aorta in relation to age. *Atherosclerosis*, 127: 155-165.

- BUCALA, R. & VLASSARA, H., 1995. Advanced glycosylation end-products in diabetic renal and vascular disease. *Am. J. Kidney Dis.*, 26:875-888.
- CARVALHO, C.A.F., 1996. Efeitos do diabetes induzido pelo aloxana e do diabetes espontâneo sobre o lobo dorsal da próstata e glândula de coagulação de camundongos C57BL/6J e NOD. Dissertação de mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP.
- CASSIM J.Y. & TOBIAS, O.S., 1968. Birefringence of muscle proteins and the problem of structural birefringence. *Biochim. Biophys. Acta*, 168:463–471.
- CERAMI, A., VLASSARA, H. & BROWNLEE, M., 1985. Protein glycosylation and the pathogenesis of atherosclerosis. *Metabolism* , 34: 37-42.
- CHAKRAVARTI, S., MAGNUSON, T., LASS, J.H., JEPSEN, K.J., LAMANTIA, C. & CARROLL, H., 1998. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J. Cell Biol.*, 141(5):1277-1285.
- CLARK, J.M. & GLAGOV, S., 1985. Transmural organization of the arterial media: the lamellar unit revisited. *Arteriosclerosis*, 5:19-34.
- CLOSS P.A.C. & CHRISTGAU S., 2002. Non-enzymatic covalent modifications of proteins: mechanisms, physiological consequences and clinical applications. *Matrix Biol.*, 21:39-52.
- COMPER, W.D. 1996. Dynamic Aspects. In: *Extracellular matrix: Molecular components and interactions vol.2*. Amsterdam, Harwood Academic Publishers, 1-21.
- COTTA-PEREIRA, G., RODRIGO, F.G. & BITTENCOURT-SAMPAIO, S., 1976. Oxytalan, elaunin and elastic fibers in the human skin. *J. Invest. Dermatol.*, 66:146-148.

- COTTA-PEREIRA, G., DEL-CARO, L.M. & MONTES, G.S., 1984. Distribution of elastic system fibers in hyaline and fibrous cartilages of rat. *Acta Anat.*, 119:80-85.
- DAXER, A. & FRATZEL, P., 1997. Collagen fibril orientation in the human corneal stroma and its implications in Keratoconus. *Invest. Ophthal. Visual Sci.*, 38:121-129.
- DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL, 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *New Engl. J. Medical*, 329:977-986.
- DICKERSON, R.E. & GEIS, I., 1969. The structure and action of proteins. HARPER & ROW, Publishes/New York. p. 1-120, pp.12.
- DINGEMANS, K.P., JANSEN, N. & BECKER, A.E., 1981. Ultrastructure of the normal human aortic media. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.*, 392:199-216.
- DOUGHTY, M.J. & BERGAMNSON, J.P.G., 2005. Resolution and reproducibility of measures of the diameter of small collagen fibrils by transmission electron microscopy – application to the rabbit corneal stroma. *Micron*, 1-13.
- FARREL, R.A., 1994. Corneal transparency. In: ALBERT, D.M. & JAKOBIEC, F.A. (Eds.). *Principle and Practice of Ophtahmology, Basic Sciences*, Saunders, London, pp.64-81.
- FARREL, R.A., FREUND, D.E. & MCCALLY, R.L., 1999. Polarized light propagation in corneal lamellae. *J. Refrac. Surg.*, 15:700-705.
- FUKADA, E., 1974. Piezoelectric properties of organic polymers. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 238:7-25.
- GANONG, W.F., 1977. Funções endócrinas do pâncreas e regulação do metabolismo de carboidratos. In: *Fisiologia Média*. Ed. Atheneu. 3: 251-257.

- GOLDMAN, J.N., DOHLMAN, G.B., BENEDEK, C.H. & KRAVITT, B., 1968. Structural alterations affecting transparency in swollen human corneas. *Invest. Ophthalm. Visual Sci.*, 7:501-519.
- GOSLINE, J.M., 1976. The physical properties of elastic tissue. *Connec. Tissue Res.*, 7:211-249.
- HASCALL, V.C. & HASCALL, K.G., 1985. Proteoglycans. In: HAY, E.D. *Cell biology of extracellular matrix*. New York: Plenum Press, 417p, pp.39-63.
- HAY, E.D., 1991. *Cell biology of extracellular matrix*. New York: Plenum Press, 417p.
- HEDBOM, E., ANTONSSON, P., HJERPE, A., AESCHLIMANN, D., PAULSOON, M. PIMENTEL, E.R., WENDEL, M., OLDBERG, A. & HEINEGARD, D., 1992. Cartilage matrix proteins. An acidic protein (COMP) detected only in cartilage. *J. Biol. Chem.* 267:6132-6136.
- HEDGE, P.S., CHANDRAKASAN, G. & CHANDRA, T.S., 2002. Inhibition of collagen glycation and crosslinking *in vitro* by methanolic extracts Finger millet (*Eleusine coracana*) and Kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*). *J. Nutri. Biochem.*, 13(9):517-521.
- HEINEGARD, D. & PIMENTEL, E.R., 1992. Cartilage matrix proteins. In: *Articular cartilage and osteoarthritis*. New York, pp.95-111.
- HIGASHI, T., SANO, H., SAISHOJI, T., IKEDA, K., JINNOUCHI, Y., KANZAKI, T., MORISAKE, N., RAUVALA, H., SHICHIRE, M. & HORIUCHI, S., 1997. The receptor for advanced glycation end-products mediates the chemotaxis of rabbit smooth muscle cells. *Diabetes*, 46:463-472.
- IHANAMAKI, T., PELLINIEMI, L.J. & VUOVORIO, E., 2004. Collagens and collagen-related components in the human and mouse eye. *Progress Retin. Eye Res.*, 23:403-434.

- JACKSON, D.S. & BENTLEY, J.P., 1968. Collagen-glycosaminoglycans interactions. In: Treatise on Collagen, Gould, B.S. (ed), vol.2, Academic Press, New York and London, pp.189-211.
- JAROSNKI, J.W. & KASPRZA, H.T., 2003. Linear birefringence measurements of the *in vitro* human cornea. *Ophthal. Physiol. Optical*, 23: 361-369.
- KASUYA, Y., ITO, M., NAKAMURA, J., HAMADA, Y., NAKAYAMA, M., CHAYA, S., KOMORI, T., NARUSE, K., NAKASHIMA, E., KATO, K., KOH, N. & HOTTA, N., 1999. An aldose reductase inhibitor prevents the intimal thickening in coronary arteries of galactose-fed beagle dogs. *Diabetologia*, 42: 1404-1409.
- KLYCE, S.D. & BEUERMAN, R.W., 1988. Structure and function of the cornea. In: KAUFMAN, H.E., BARRON, B.A., McDONALD, M.B. & WALTMAN, S.R., editors. The cornea. New York, Churchill Livingstone, pp.3-54.
- KOMAI, Y. & USHIKI, T., 1991. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest. Ophthal. Visual Sci.*, 32:2244-2258.
- KREIS, T. & VALE, R., 1999. Elastin. In: Guidebook to the Extracellular Matrix. Anchor, and Adhesion Proteins (KREIS T, VALE R, eds) Oxford University Press, New York, pp.414-417.
- LAURENCE, D.J.R., 1966. Interaction of calf thymus histones fractions in aqueous solution with 8-anilino-naphthalene-1-sulphonic acid. *Biochem. J.*, 99:419-422.
- LEE, R.E. & DAVISON, P.F., 1984. The collagens of the developing bovine cornea. *Exp. Eye Res.*, 39: 639-652.
- LEHN, J.M., 2002. Toward self-organization and complex matter. *Science*, 295:2400-2402.

- LINSENMAYER, T.F., 1985. Collagen. In: HAY, E.D. Cell biology of extracellular matrix. New York: Plenum Press, 417p, pp5-37.
- LISON, L., 1960. Histochimie et Cytochimie Animales: Principes et Methodes. Gauthier-Villar. Paris. pp.293-294; pp.415-417; pp523.
- LOHMANDER, L.S., DE LUCA, S., NILSSON, B., HASCALL, V.C., CAPUTO, C.B. & KIMURA, J.H., 1980. Oligosacharides on proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. J. Biol. Chem., 255(13):6084-6091.
- LOUIS-DORR, V., NAOUN, K., ALLÉ, P., BENOIT, A.N. & RASPILLER, A., 2004. Linear dichroism of the cornea. Appl. Optics, 43:1515-2521.
- MALIK, N.S., MOSS, S.J. AHMED, N., FURTH, A.J., WALL, R.S. & MEEK, K.M, 1992. Ageing of the human corneal stroma. Biochem. Biophys. Acta, 1138: 222-228.
- MARTINS, S.A.R., 2005. Efeito agudo da cirurgia refrativa sobre a síntese de proteoglicanos em explantes de córnea humana. Tese de doutorado. Departamento de Bioquímica e Oftalmologia. Universidade Federal de São Paulo, SP.
- MASSI-BENEDETTI, M. & FEDERICI, M.O., 1999. Cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: the role of hyperglycaemia. Exp. Clin. Endocr. Diabetes, 107:120-123.
- MATHEWS, M. B., 1965. The interaction of collagen and acid mucopolyscharides – a model for connective tissue. Biochem. J., 96:710-716.
- MAURICE, D.M., 1957. The structure and transparency of the corneal stroma. J. Physiol., 136:263-286.
- MAURICE, D.M., 1984. The cornea and sclera. In: DAVISON, H. (Ed.). the Eye, 3<sup>rd</sup> ed. Academic Press, New York, pp.1-158.

- MECHAN, R.P. & HEUSER, J.E., The elastic fibers. In: Cell Biology of Extracellular Matrix, Plenum Press, New York, pp.79-106.
- MEEK, K.M & FULLWOOD, N.J., 2001. Corneal and scleral collagens – a microscopist's perspective. *Micron*, 32:261-272.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C., 1973. Anisotropic properties of toluidine blue-stained collagen. *Ann. Histochem*, 18:103-122.
- MICHELACCI, Y.M., 2003. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 36(8): 1037-1046.
- MILCH, R.A., 1965. Matrix properties of the aging arterial wall. *Monographs in the Surgical Sciences, USA*, 2(4):261-341.
- MONNIER, V.M., 1989. Maillard theory of ageing. In: BAYNES, J.W., MONNIER, V.M. (Eds.), *The Maillard reaction in aging, diabetes, and nutrition*. Alan R. Liss, New York, pp.1-22.
- MÜLLER, L.J., PELS, E., SCHURMANS, L.R.H.M. & VRENSSEN, G.F.J.M., 2004. A new three-dimensional model of the organization of proteoglycans and collagen fibers I the human corneal stroma. *Exper. Eye. Res.*, 78:494-501.
- NELSON, D.L. & COX, M.M., 2002. Carboidratos e glicoconjugados e aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: NELSON, D.L. & COX, M.M. *Lehninger – Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Savier, 975p, pp.94-240.
- NEWTON, R.H. & MEEK, K.M., 1998. The integration of the corneal and limbal fibrils in the human eye. *Biophys. J.*, 75:2508-2512.
- NORDÉN, B., 1978. Applications of linear dichroism spectroscopy. *Appl. Spectr. Review*, 14:157–248.

- ORIEL, P.J. & SCHELLMAN, J.A., 1966. Studies of the birefringence dispersion of polypeptides and proteins. *Biopolymers*, 4:469–494.
- PIEZ, K.A. & REDDI, A.H., 1984. Fibronectin, laminin, and others extracellular glycoproteins. In: HAKAMORI, S., FUKUDA, M., SEKIGUCHI, K., CARTER, W.G. *Extracellular Matrix Biochemistry*, New York: Elsevier Science. 452p, pp.288-305.
- PIMENTEL, S.B. & CARVALHO, H.F., 2003. Cellular aspects of the elastogenesis in the elastic tendon of the chicken wing. *Cell Biol. Int.*, 27(7):579-598.
- QUANTOCK, A.J., MEEK, K.M., RIDGEWAY, A.E.A., BRON, A.J. & THONAR, E.J.M.A., 1990. Macular corneal dystrophy: reduction in both corneal thickness and collagen interfibrillar spacing. *Curr. Eye Res.*, 9:393-398.
- RADDA, G.K., 1973. Probes for enzyme conformation. In: THAYER A. A. & SENETZ M., ed. *Fluorescence Techniques in Cell Biology*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer, pp.261-272.
- REDDY, G.K., 2004. AGE-related cross-linking of collagen is associated with aortic wall matrix stiffness in the pathogenesis of drug-induced diabetes in rats. *Microvasc. Res.*, 68:132-142.
- REDDY, G.K., GUM, S., STEHNO-BITTEL, L. & ENWEMEKA, C.S., 1998. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part I. Effect of rigid plaster casts a functional casts. *Med. & Sci. in Sports & Exercises*, 794-800.
- RITTIE, L., BERTON, A., MONBOISSE, J.C., HORNEBECK, W. & GILLERY, P., 1999. Decreased contraction of glycated collagen lattices coincides with impaired matrix metalloproteinase production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264:(2)488-492.



- ROBERT, L., LEGEAIS, J.M., ROBERT, A. M. & RENARD, G., 2001. Corneal collagens. *Pathol. Biol.*, 49: 353-363.
- ROSS, R., 1999. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *New Engl. J. Med.*, 340:115-126.
- ROSSELET, A. & RUCH, F., 1968. Cytofluorometric determination of lysine with dansylchlorid. *J. Histochem. Cytochem.*, 16:459-466.
- RUEF, J., LIU, S.Q., BODE, C., TOCCHI, M., SRIVASTAVA, S., RUNGE, M.S. & BHATNAGAR, A., 2000. Involvement of aldose reductase in vascular smooth muscle cell growth and lesion formation after arterial injury. *Arterosc. Trombos. Vasc. Biol.*, 20:1745-1752.
- SANDBERG, M., TAMMINEN, M., HIRVONEN, H., VUORIO, E. & PIHLAJANIEMI, T., 1989. Expression of mRNAs coding for the Cα1n of type XIII collagen in human fetal tissues: comparison with expression of mRNAs for collagen types I, II and III. *J. Cell. Physiol.*, 109:1371-1379.
- SANDBERG, M., HIRVONEN, H., ELIMA, K.J. & VUORIO, E., 1993. Co-expression of collagens II and XI and alternative splicing of exon of collagen II in several developing human tissues. *Biochem. J.*, 294: 595-602.
- SCOTT, J.E., 1995. Extracellular matrix, supramolecular organization and shape. *Anatom.*, 187:259-269.
- SILBERMANN, M. & FROMER, J., 1973. Dynamic changes in acid mucopolysaccharides during mineralization of the mandibular condylar cartilage. *Histochem.*, 36:185-192.

- SCHNIDER, A.M. & KOHN, R.R., 1982. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility of collagen from human skin, tracheal cartilage and dura mater. *Exper. Gerontol.*, 17:185-194.
- STANWORTH, A. & NAYLOR, E.J., 1950. The polarization optics of the isolated cornea. *British. J. Ophthal.*, 34:201-211.
- STEFAN, S.I., 1996. Definition and classification of diabetes including maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes mellitus – a fundamental and clinical text*. Cap. 27.
- STEBBENS, W.E., 1996. Structural and architectural changes during arterial development and the role of hemodynamics. *Acta Anat.*, 157:261-274.
- STEHNO-BITTEL, L., REDDY, G.K., GUM, S. & ENWEMEKA, C.S., 1998. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part I. Effect of rigid plaster casts a functional casts. *Med. & Sci. in Sports & Exercises*, 788-793.
- STRYER, L., 1965. The interaction of naphthalene dye with apomyoglobin – a fluorescent probe of non-polar binding sites. *J. Mol. Biol.*, 13:482-495.
- SWEET, M.B., THONAR, E.J. & IMMELMAN, A.R., 1977. Regional distribution of water and glycosaminoglycan in immature articular cartilage. *Biochim, Biophys. Acta*, 500(1):173:86.
- TAYLOR, E.W. & CRAMER, W., 1963. Birefringence of protein solutions and biological systems-II. Studies on TMV tropocollagen and paramyosin. *Biophys. J.*, 3:143-154.
- TIMBERLAKE, G.T., REDDY, G.K., STEHNO-BITTEL, L., WEBER, J.F., AMSLINGER, S. & GIVENS, R.S., 2002. Photoactives Coumaryl-diazopyruvate fluorescent label for amine functional groups of tissues containing type-I collagen. *Photochem. Photobiol.*, 76: 473-479.

- TOEPFER, K., 1970. Die Thiazinfarbstoffe. Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart.
- TOMIZAWA, H., YAMAZAKI, M., KUNIKI, K., ITAKURA, M. & YAMASHITA, K., 1993. Association of elastin glycation and calcium deposit in diabetic rat aorta. *Diabetes Res. Clin.*, 19:1-8.
- VAN BLOKLAND, G.J. & VERHELST, S.C., 1987. Corneal polarization in the living human eye explained with a biaxial model. *J. Ophthalmol. Soc. Amer.*, 4:82-90.
- VAN DER REST, M. & GARRONE, R., 1991. Collagen family of proteins. *FASEB J.*, 5:2814-2823.
- VIDAL, B.C., 1963. Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. *Protoplasma*, 56:529-536.
- VIDAL, B.C., 1964. The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of collagen. *Protoplasma*, 59:472-479.
- VIDAL, B.C., 1972. Toluidine blue: Cotton effect-like phenomena produced by crystal aggregates obtained by drying on microscopic slides. *Ann. Histochem.*, 17: 151-157.
- VIDAL, B.C., 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell. Mol. Biol.*, 22:45-64.
- VIDAL, B.C., 1978. The use of the fluorescent probe 8-anilino-naphthalene sulfate (ANS) for collagen and elastin histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 26:196-201.
- VIDAL, B.C., 1980. The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cell. Mol. Biol.*, 26:415-421.

- VIDAL, B.C., 1984. Orden molecular y haces de colageno. In: Trabajos del Instituto Cajal. LXXV. P.p.19-27.
- VIDAL, B.C., Métodos em Biologia Celular. In: VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. Biologia Celular. Rio de Janeiro. Atheneu, 1987. 348p. pp.05-34.
- VIDAL, B.C., 1994. Cell and extracellular matrix interaction: a feed back theory based on molecular order recognition-adhesion events. Rev. Fac. Ciên. Méd./UNICAMP, 4:1-11.
- VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S., 1984. Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. Cell. Mol. Biol., 30(3):195-204
- VLISSARA, H., 1994. Recent progress on the biological and clinical significance of advanced glycosilation endproducts. J. Lab. Clin. Med., 124:19-30.
- WAN, Q., COTE, G.L. & DIXON, J.B., 2005. Dual-wavelength polarimetry for monitoring glucose in the presence of varying birefringence. J. Biomed. Opt., 10(2):024-029.
- WARING III G.O., 1984. Corneal structure and pathophysiology. In: LEIBOWITZ, H., Corneal disorders: clinical diagnosis and management. Philadelphia, pp.3-25.
- WESS, T.J., WESS, L., MILLER, A., LINDSAY, R.M., BAIRD, J.D., 1993. The in vivo glycation of diabetic tendon collagen studied by neutron diffraction. J. Mol. Biol., 230:1297-1303.
- YANG Y. & SANTAMARIA P., 2003. Dissecting autoimmune diabetes through genetic manipulation of non-obese diabetic mice. Diabetologia, 46: 1447-1464.
- ZIMMERMAN D.R., TRUEB, B., WINTHERHALTER, K. H., WITTMAR, R. & FISHER, R.W, 1986. Type VI collagen is a major component of the corneal human. FEBS Letters, 197: 55-58.

## **ARTIGOS**

---

O presente estudo originou dois artigos científicos. Ambos aceitos para publicação em revistas especializadas.

### **ARTIGO I**

Aldrovani M., Guaraldo AMA., Vidal BC. 2007. Optical anisotropies in corneal stroma collagen fibers from diabetic spontaneous mice. Vision Research. DOI: 10.1016/j.visres.2007.02.011. Versão “pré-print”.

### **ARTIGO II**

Aldrovani M., Guaraldo AMA., Vidal BC. 2007. Fluorescence, birefringence and confocal microscopy of the abdominal aorta from nonobese diabetic (NOD) mice. Acta Histochemica. DOI: 10.1016/j.acthis.2007.01.003. Versão “pré-print”.

## **ARTIGO I**

---

# Optical anisotropies in corneal stroma collagen fibers from diabetic spontaneous mice

M. Aldrovani <sup>a</sup>, A. M. A. Guaraldo <sup>b</sup>, B. C. Vidal <sup>a, \*</sup>.

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, Institute of Biology; <sup>b</sup> Multidisciplinary Center of Biological Investigation, State University of Campinas (UNICAMP), 13083-863, Campinas, SP, Brazil.

\*Corresponding author: Tel.: +55 19 3521 6123; fax: +55 19 3521 6111.

E-mail address: [camposvi@unicamp.br](mailto:camposvi@unicamp.br) (B.C. Vidal).

**Running title:** Optical anisotropies of the diabetic cornea



## **Abstract**

In this work, optical retardation (OR) was investigated in corneal stroma collagen fibers from nonobese diabetic (NOD mice) and healthy (BALB/C) mice. Linear dichroism (LD) was investigated in corneas stained with Ponceau SS and Toluidine Blue, using microspectrophotometer. NOD corneas showed higher OR values than the control. Ponceau SS-complexed collagen fibers showed positive LD that was higher for NOD corneas. After staining with Toluidine Blue, NOD and BALB/C corneas showed negative LD. The results of this study demonstrate that diabetes was capable of altering the corneal optical anisotropies, possibly altering the number of intermolecular crosslinks in collagen fibers.

*Keywords:* Birefringence; Collagen; Cornea; Diabetes; Dichroism

## 1. Introduction

The cornea is an aspheric and transparent structure that consists of a central portion known as stroma, covered anteriorly with stratified epithelium and posteriorly with endothelium (Maurice, 1957; Klyce & Beuerman, 1988; Michelacci, 2003). The stroma represents the majority of the corneal thickness and exhibits a fine structure characterized by layers of stacked lamellae (Maurice, 1957; Jaronski & Kasprzak, 2003). Each lamella is composed of regularly spaced collagen fibrils that, in general, run parallel to each other and the corneal surface, but they form large angles with fibrils in adjacent lamellae (Komai & Ushiki, 1991; Farrel, Freund & McCally, 1999; Meek & Fulwood, 2001). Various studies have reported that regular spacing of the collagen fibrils is essential for corneal biomechanical and transparency (Maurice, 1957; Goldman, Dohlman, Benedek & Kravitt, 1968; Farrell, 1994). In addition, other factors, such as uniform diameter of the collagen fibrils, stroma proteoglycans (PGs) and stroma hydration also contribute to corneal transparency (Maurice, 1957; Quantock, Meek, Ridgeway, Bron & Thonar, 1990; Chakravarti, Magnusson, Lass, Jepsen, Lamantia & Carroll, 1998).

The composition and 3-D organization of stroma collagen fibers confer the cornea important polarizing properties and optical anisotropies known as birefringence and linear dichroism (LD) (van Blokland and Verhelst, 1987; Maurice, 1984; Bueno & Jaronski, 2001; Bueno & Vargas-Martin, 2002; Jaronski & Kasprzak, 2003; Louis-Dorr, Naoun, Allé, Benoit & Raspiller, 2004). Several

authors have admitted that collagen fibers possess two types of birefringence: Intrinsic or crystalline birefringence and form or textural birefringence (Vidal, 1964; Bennet, 1967; Whittaker, Bouhner, Perkins & Canhan, 1987; Jaronski & Kasprzak, 2003). Intrinsic birefringence occurs when many electronic resonators ( $\pi$ - $\pi^*$ -transitions from the collagen molecules planar peptide bonds) in a medium with more than one refractive index display preferred directions of symmetry, leading the medium as a whole to transmit light with different directions of polarization or propagation (Wied, 1966; Oriel & Schellman, 1966; Bennet, 1967). In contrast, form birefringence depends on the subwave dimension and geometry of the collagen molecule, i.e., the compatibility of photon wavelength and collagen molecules, the aggregation/packing state and the spatial organization of the bundle/fiber components (Vidal, 2003; Wied, 1966; Bennet, 1967).

Birefringence and LD measurements provide information regarding variability in the molecular order, orientation and aggregational state of the collagen fibers (Vidal, 1964; Geday, Kamisnky, Lewis & Glazer, 2000; Vidal, 2003; Silva, Vidal, Zezell, Zorn, Núñez & Ribeiro, 2006); corresponding to the ideal methods for detecting molecular alterations in anisotropical structures, as confirmed for second harmonic generation and X-ray diffraction studies (Stein & Norris, 1956; Roth & Freund 1986).

Since the discovery of stroma collagen fiber optical anisotropies, many researchers have used these phenomena as tools to investigate the cornea during different physiological and pathological conditions (van Blokland and Verhelst,

1987; Newton & Meek 1998; Bueno & Jaronski, 2001; Bueno & Vargas-Martin, 2002; Jaronski & Kasprzak 2003). In this context, investigating eventual changes in corneal optical anisotropies caused by diabetes is also relevant.

Diabetes is an endocrine disorder characterized by hyperglycemia that causes nonenzymatic glycosylation of collagen and other extracellular proteins (Bailey, Paul & Knott, 1998; Mentink, Hendriks, Levels & Wolffenbuttel, 2002; Ahmed, 2005). Nonenzymatic glycosylation is associated with a number of physicochemical changes in several structures rich in connective tissue (Schnider & Kohn 1982; Andreassen, Oxlund & Danielsen, 1988; Sady, Khosrof & Nagaraj, 1995; Bailey et al., 1998; Reddy, Stheno-Bittel & Enwemeka, 2002; Mentink et al., 2002). It is established that nonenzymatic glycosylation affect various properties of collagen, including its ability to form supramolecular aggregates, its susceptibility to thermal degradation, its nonlinear susceptibility, its positive charge distribution and its autofluorescence, crystallinity and turnover (Andreassen et al., 1988; Hadley, Meek & Malik, 1998; Kim, Eichler, Reiser, Rubenchik & Silva, 2000; Closs & Christgau 2002; Mentink et al., 2002; Ahmed, 2005).

In mouse corneas, observation verified that an increase in the glycosylation levels reduces the diameter of the stroma collagen fibers causing corneal opacity (Chakravarti, Magnuson, Lass, Jepsen, Lamantia & Carroll, 1998), and possibly prejudices the corneal biomechanical and optical anisotropic properties, beyond the visual function. Additionally, changes in molecular packing have been reported for glycosylated corneal and scleral collagen (Malik, Moss, Ahmed, Furth, Wall & Meek, 1992; Malik & Meek, 1994).

In this work, optical retardation (OR) associated with intrinsic and form birefringences and LD in corneal stroma collagen fibers from nonobese diabetic (NOD) and healthy (BALB/C) mice were investigated. The contribution of stroma PGs to optical anisotropic properties of the cornea was also investigated in NOD and BALB/C mice.

## 2. Methods

### *2.1. Theory: Definition for OR and LD*

Anisotropy in media leads to changes in the polarization of light (Born & Wolf, 1980, Savenkov & Sydurok, 2005). There are two known mechanisms of anisotropy. Polarization may be altered through changes in the phase of the components of the electric vector  $\mathbf{E}$  (birefringence) or changes in the amplitude of the components of the electric vector  $\mathbf{E}$  (dichroism). In collagen fibers, these two mechanisms act simultaneously.

#### *2.1.1. OR*

If light is introduced into an anisotropic medium, the orthogonal components of the electric vector  $\mathbf{E}$  will experience different refractive indices, since the plane of polarization of the incident light will not be parallel to one of the medium's optical axes (Born & Wolf, 1980; Maitland & Walsh, 1997). As the orthogonal components of the electric vector  $\mathbf{E}$  travel at different velocities, the vector components

experience a phase shift relative to one another. The phase shift,  $\delta$ , can be represented by (Bloss, 1961; Maitland & Walsh, 1997; Born & Wolf, 1980; Silva et al., 2006),

$$\delta = (2\pi/\lambda) L\Delta n_D$$

where,  $\delta$  is the phase shift between propagating orthogonal polarizations (radians),  $L$  is the thickness of the sample,  $\Delta n_D$  is the difference in the refractive indices between two of the optical axes in a anisotropic sample, and  $\lambda$  is the light wavelength in a vacuum. Each wavelength is associated with a  $2\pi$  radian phase change. The quantity  $L\Delta n_D$  is known as the optical path difference (OPD) or optical retardation (OR). It is the difference between the two optical path lengths.

When OR is measured (using compensators) in birefringent material subsequently imbibed in solutions of different refractive indices, the OR values obtained in each solution can be plotted as a function of the refractive index of the respective solution (Vidal, 1964, Bennet, 1967). Thus, form birefringence curves are constructed. Form birefringence curves are characteristically U-shaped, the U being concave upwards in the case of a material with positive form birefringence, such as collagen. The distance between the minimum point of such a curve and the line of zero birefringence indicates the degree of intrinsic birefringence which characterizes the material. Thus, a form birefringence curve informs on form birefringence and the degree of intrinsic birefringence.

### *2.1.2. LD*

Dichroism is defined as the difference in absorption between orthogonal polarizations (Bennett, 1967; Born & Wolf, 1980; Beydaghyan, Kamisnka, Brown & Robbie, 2004). The physical basis of dichroism is based on the theories of dispersion and absorption. In LD, the absorption varies as the azimuth of the electric vector of the polarizer (EVL P) changes with respect to some fixed axis of the object. The quantitative treatment of dichroic phenomena depends on the measurement of absorption according to spectrophotometry techniques (Bennet, 1967; Vidal, 1970; Born & Wolf, 1980; Vidal, Mello & Pimentel, 1982; Vidal & Mello, 2005).

## *2.2. Material*

Ten female NOD/Uni mice (16 weeks old and 28 days of diabetes expression) and 10 female BALB/c/Uni mice (controls) of the same age were obtained from the Multidisciplinary Center of Biological Investigation (CEMIB) of the State University of Campinas, Brazil. The use of NOD mice in this study was chosen, because they develop a form of chronic autoimmune diabetes (Colluci, Bergman, Penha-Gonçalves, Cilio & Holmberg, 1997), shown to be a useful model to assess the effects of the nonenzymatic glycosylation of extracellular proteins.

Glycemia levels in NOD mice were measured approximately 6 hours before the mice were killed. A blood sample was obtained by caudal puncture and analyzed by the automatic glucose meter Accu-Chek Active (Roche Diagnostica

Brasil Ltd.), which measures glycemia in an interval defined between 10-600 mg/dL or 0.6-33.3 mmol/L. Values outside this interval are indicated as “LO” when glycemia is lower than 10 mg/dL (0.6 mmol/L) or “HI” when glycemia is higher than 600 mg/dL (33.3 mmol/L). All the NOD mice used in this study presented “HI” glucose levels (chronic hyperglycemia).

The mice were killed by decapitation, and their eyes were enucleated. The left eye of each mouse was fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 24 h, processed for routine inclusion in Histosec<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt, Germany), sectioned in 8  $\mu\text{m}$  thicknesses and used for birefringence and LD analyses. In contrast, the right eye of each mouse was fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h, rinsed in distilled water (1 h), the cornea was removed from the eyeball, dehydrated in 70% ethanol (1 h), conserved in 80% ethanol at 9°C and used only for birefringence analysis.

All the protocols involving animal care and use were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the State University of Campinas and met the Guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

### *2.3. Measurements of the polarization properties*

#### *2.3.1. OR*

Collagen fiber birefringence OR measurements were realized using whole (or *in totum*) and sectioned (8  $\mu\text{m}$ ) corneas.



*Whole corneas* – Unstained whole corneas were placed on a glass slide and imbibed for 1h in water ( $n_D = 1.333$ ) and pure glycerol ( $n_D = 1.471$ ), respectively. For each imbibing solution, 150 measurements of OR were realized in NOD and BALB/c collagen fibers oriented at  $45^\circ$  relative to the plane of polarized light (PPL), using a Zeiss Pol-microscope (Zeiss, Oberkochen Germany) (Fig. 1) equipped with a 40x objective and monochromatic light ( $\lambda = 546$  nm).

The angle of the phase difference ( $\delta$ ) obtained through the measurements was converted to the birefringence OR (in nanometers) using the Bräce-Köhler  $\lambda/10$  (for measurements realized in water) and  $\lambda/20$  (for measurements realized in pure glycerol) methods as follow:

$$\text{Bräce-Köhler } \lambda/10 \quad \text{OR} = 47.20\sin(2\phi)$$

$$\text{Bräce-Köhler } \lambda/20 \quad \text{OR} = 27.35\sin(2\phi)$$

where: 47.20 and 27.35 are the retardation of the compensators;  $\phi$  is 45deg- $\delta$ , where 45 deg is the position of the collagen fibers long axis relative to the PPL (Vidal, 1964; Roth & Freund, 1982; Whittaker et al., 1987; Montarou & Gaylord 2004; Silva et al., 2006).

*Histological sections* – OR associated with form and intrinsic birefringences were measured in histological sections imbibed for 1h in solutions of different refractive indices: Water ( $n_D = 1.333$ ), water-glycerol mixtures ( $n_D = 1.360, 1.386, 1.413$  and  $1.435$ ), pure glycerol ( $n_D = 1.471$ ) and Nujol mineral oil ( $n_D = 1.479$ ) (Vidal, 1964; Bennet, 1967; Roth & Freund, 1982; Whittaker et al., 1987). For each imbibing solution, 150 measurements of OR were performed on NOD and BALB/c

collagen fibers oriented at 45° relative to the PPL, using the same working conditions described for whole cornea analysis. OR values associated with form birefringence were determined, in water and water-glycerol mixtures, using Bräcke-Köhler  $\lambda/10$  compensator. In pure glycerol, the OR associated with intrinsic birefringence was determined using Bräcke-Köhler  $\lambda/20$  compensator.

Some histological sections were treated with hyaluronidase from bovine testis (1 mg enzyme/mL of 0.9% NaCl) in a humid chamber (37° C) for 6 h (Vidal, 1964; Jackson & Bentley, 1968; Kiernan, 1990) and imbibed in water for 1 h; the OR was determined only for the refractive index corresponding to this imbibing solution. The enzymatic treatment with hyaluronidase from bovine testis was used to determine the contribution of glycosaminoglycans (GAGs) (chondroitin 4-and-6-sulfates and dermatan sulfate) to the collagen fiber birefringence.

### *2.3.2. LD*

Since collagen fibers and glycosaminoglycans of PGs do not present LD in the visible range of light, extrinsic LD was investigated in sections stained with Ponceau SS pH 2.5 and Toluidine Blue pH 4.0 (Vidal, 1970; Vidal & Mello, 1970; Vidal & Mello, 2005). Ponceau SS is a rod-like azo-dye with a geometric and chemical structure that meet the conditions for orientation in collagens forming a complex endowed with crystallinity and high optical anisotropy (Vidal & Mello, 2005; Vidal & Volpe, 2005). Toluidine Blue was used to detect the general

distribution of  $\text{CO}^{-2}$  and  $\text{SO}^{-3}$  anionic groups (glycosaminoglycans of PGs) in the corneal stroma (Lison, 1960; Vidal & Mello, 1984). Some sections treated with hyaluronidase from bovine testis were stained with Toluidine Blue and used for morphological analyses.

Spectral absorption and extrinsic LD were determined in a Zeiss automatic scanning microspectrophotometer (Oberkochen, Germany) (Fig. 2) equipped with a Planapo 40x objective, optovar 2, measured diaphragm diameter of 0.1 mm, field diaphragm diameter of 0.2 mm, and 100-W/12-V lamp; as previously proposed (Vidal, 1970; Vidal et al., 1982; Vidal & Mello 2005).

Spectral absorption curves were plotted with absorbances obtained for corneal collagen fibers positioned parallel ( $A_{PA}$ ) and perpendicular ( $A_{PE}$ ) to the EVPL at wavelengths from 500-550 nm for sections stained with Ponceau SS, and wavelengths from 500-600 nm for sections stained with Toluidine Blue. The wavelengths were obtained with a Schott monochromator filter ruler (Oberkochen, Germany).

Values of LD ( $A_{PA}-A_{PE}$ ) and dichroic ratios ( $DR = A_{PA}/A_{PE}$ ; the DR parameter indicates the molecular orientation of the specimen irrespective of its thickness) (Vidal, 1970; Vidal et al., 1982) were calculated with the median of 30 measurements of  $A_{PA}$  and  $A_{PE}$  obtained for each group studied (10 corneas from each group, 3 sections each).

Absorbance computation was obtained by comparison of the absorbing image to the unstained background that had been calibrated for 100% transmittance each time a new image was analyzed.

## *2.4. Statistical analysis*

All calculations and statistical analyses were performed using the Minitab 12™ software (State College, PA, USA) and involved analysis of variance (ANOVA) and Mann-Whitney (MW) non-parametric test. Differences were considered statistically significant when P values < 0.05. Form birefringences curves and spectral absorption curves were constructed using the Origin 50™ software (Microcal Inc., USA).

## **3. Results**

### *3.1. OR*

Birefringence brightness analysis allowed for characterization of the morphology and topography of stroma collagen fibers. Unstained NOD and BALB/c whole corneas presented no area of complete birefringence extinction when rotating the microscope stage. Whole corneas showed stroma collagen fibers intercrossed in different spatial planes and oriented in more than one direction along the corneal trajectories (Fig. 3 A, B).

In the histological sections, when the cornea long axis was oriented at 45° relative to the PPL, the brightness along the collagen fibers was not homogeneous. Maximum birefringence was observed in stroma collagen fibers oriented at 45°

relative to the PPL (Fig 3 C, D). The hues of brightness corresponded to different angles of the collagen fibers lamellae relative to the PPL. When the corneal axis was oriented parallel or perpendicular to the PPL, the stroma showed small undulations (Fig. 3 E, F).

OR analysis, using wavelength from 546 nm, revealed that stroma collagen fibers of whole corneas showed smaller OR mean values, but similar standard deviation, when compared with collagen fibers of corneas sections in the same experimental conditions (NOD vs. NOD and control vs. control) (Table 1).

NOD whole and sectioned corneas showed higher birefringence OR values in all imbibing solutions used, when compared to the healthy controls. Form birefringence curves obtained by plotting the average OR values in nanometers as a function of the refractive indices of the imbibing solutions, revealed differences between NOD and BALB/c corneas (Fig. 4). After treatment with hyaluronidase, a significant reduction ( $P_{0.000}$  level, ANOVA) in the OR values of the collagen fibers from NOD and BALB/c corneas sections was observed (Table 1). The proportion of macromolecules removed by hyaluronidase was similar (26% NOD and 29% BALB/c) between the samples studied.

### *3.2. LD*

NOD and BALB/c collagen fibers complexed with Ponceau SS absorbed more polarized light, at all wavelengths used (500-550 nm), when the corneal axis

was positioned parallel to the EVLP (Fig. 5 A). However, polarized light absorption proved to be nonhomogeneous along the corneal axis, due to the different angles of collagen fiber lamellae relative to the EVLP (Fig. 6 A-B).

Analysis of the spectral absorption curves for Ponceau-stained corneas revealed absorption peaks ( $A_{PA}$  and  $A_{PE}$ ) at 520 nm (Fig. 5 A). When using the Mann-Whitney test, the parallel condition for NOD mice was far greater, so that the difference in  $A_{PA}$  vs.  $A_{PE}$  for NOD mice was large and the difference for BALB/c mice, while relatively similar in proportional terms, in absolute terms was much less (Table 2, Fig. 5 A).

Stroma collagen fibers showed positive LD and DR values that were higher for NOD corneas (Table 2).

After staining with Toluidine Blue, pH 4.0, NOD and BALB/c corneal stroma showed metachromatic reaction (Fig. 6 C-D). Treatment with hyaluronidase abolished the corneal stroma metachromasia (Fig. 6 E-F).

Toluidine Blue-stained corneas (non-treated with hyaluronidase) absorbed more polarized light, at all wavelengths used (500-600 nm), when the cornea axis was oriented perpendicular to EVLP (Fig. 5 B). Maximum  $A_{PA}$  and  $A_{PE}$  peaks were observed at 540 nm (Fig. 5 B). No statistically significant differences ( $P>0.05$ , MW) were observed between  $A_{PA}$ ,  $A_{PE}$  and DR from the NOD and BALB/c corneal stroma (Table 2, Fig. 5 B). All the samples studied showed negative LD values, because  $A_{PA}<A_{PE}$  (Table 2).

## 4. Discussion

In this work, the morphology, birefringence and LD of corneal stroma collagen fibers from diabetic and healthy mice were investigated.

Morphological analysis from NOD and BALB/c whole corneas, using polarized light microscopy, revealed that complete birefringence extinction (when the long axis of fibers is parallel to one of the polarizer they appear dark, i.e., extinction) was never obtained by rotating the microscope stage; there were always collagen fibers oriented at  $\pm 45^\circ$  relative to the PPL. This observation confirmed that stroma collagen fibers are oriented in more than one direction along corneal trajectories, as widely described in the literature.

Birefringent images contain 3-D information: topological bidimensional information in the X-Y plane of the polarizers and three-dimensional information in the Z plane due to OR observed by the brilliance of the fibers, which is a function of the angle between the fibers and the crossed PPL. Thus, variations in the intensity of birefringence brilliance and small stromal undulations, as observed in this study, during the morphological analysis of unstained histological sections, reflect the different angles of the collagen fiber lamellae in relation to the crossed PPL.

Quantitative studies of birefringence are widely used to determine molecular orientation, ordered aggregational state and concentration in liquid crystals and biopolymers, showing a strong relationship with second harmonic generation, chirality and chiroptical effects, and nonlinear optical properties (Vidal, 1963, 1964;

Cornellissen, Fisher, Sommerdichijik & Nolte, 1989; Hwang & Lee, 2003; Vidal, 2003; Ha, Han, Jeon, Jung, Park, Takezoe & Wu, 2005; Pena, Boulesteix, Dartilongue & Schane-Klein, 2005; Vidal & Mello, 2005; Silva et al., 2006; Yun, Kuboyama, Chibata & Ouzigawa, 2006). It should be mentioned that collagen fibers *in vivo* are not “solids”; the concept that they maintain liquid crystal properties is more appropriate to understanding their biological functions (Vidal, 2003). The organization and orientation of the stroma collagen fibers allow for speculation that the cornea possesses characteristics of cholesteric liquid crystal (Giraud-Guille, 1996).

The smaller birefringence OR values (wavelength from 546 nm) obtained for whole corneas, when compared to corneal sections of some experimental conditions could be associated with the corneal dense cellularity and internal birefringence extinction at the points of intercrossing of adjacent collagen fibers. Furthermore, a clear statement exists that the excised corneal punches present increased form birefringence compared with whole corneas, possibly caused by the development of asymmetric fibril tension due to pulling towards the center of section, with nothing to counteract this tension, because the opposing fibrils were removed. Differences, in terms of OR values, obtained for whole and sectioned corneas, demonstrated that information regarding optical anisotropy differ in function of the methodology used for sample preparation and analysis. Thus, different interpretations, occasionally observed in the literature, are most likely due to differences in methodological processes.



In this study, OR associated with intrinsic and form birefringences of collagen fibers were determined experimentally, using imbibing solutions with different refractive indices (Vidal, 1964; Roth & Freund, 1982; Whittaker et al., 1987). The lowest OR values noted in pure glycerol inform on the degree of intrinsic birefringence; OR values measured in water-glycerol mixtures provide information regarding the form birefringence; and OR values measured in water provide information regarding total birefringence (intrinsic and form) (Vidal, 1964; Whittaker et al., 1987; Silva et al., 2006).

The form birefringence curves of the NOD cornea revealed that diabetes increased the intrinsic and form birefringence OR values of the stroma collagen fibers, suggesting that due to the disease the collagen fibers become more crystalline and densely packed than in the control. Alterations in the molecular packing of glycosylated collagen have received contradictory reports from several authors using different methodologies (Tanaka, Avigad, Brodsky & Eikenberry, 1988; Reiser, Amigable & Last, 1992; Kim et al., 2000; Aldrovani, Mello, Guaraldo & Vidal, 2006). It is possible to speculate that the molecular conformation of the different sugars used in the glycosylation *in vitro* process introduce different interferences in the structural changes observed in collagen. In addition, since the preferential glycosylation sites are strongly influenced by variations in the collagen structure (helical patch, for example) (Reiser et al., 1992), it is possible that collagen molecular packing is differentially affected by nonenzymatic glycosylation.

The increase in intrinsic birefringence (crystallinity) of collagen fibers can be attributed to the increase of total electronic transitions on the collagen molecules

planar peptide bonds (Sinex, 1968). Additionally, crosslinks mediated by nonenzymatic glycosylation, as reported by several authors (Schnider & Kohn, 1981; Reddy et al., 2002), can be associated with increased form birefringence (molecular packing). However, since birefringence is proportional to the collagen content (Vidal, 1966), is possible that an increase in collagen synthesis also contributes to the higher form birefringence observed in NOD cornea.

LD observed in Ponceau SS-supramolecular collagen association is caused by electronic transitions along the major axis of the rod-like dye, where the chromophores  $-N=N-$  are aligned, supporting the idea that the dye molecules are parallel to the principal axis of the collagen molecules (Vidal & Mello 2005). Ponceau SS is an ideal dye for detecting changes in the macromolecular orientation of collagen fibers. Nonhomogeneous absorption of polarized light along the cornea axis confirmed the results of the morphological analysis of the birefringence, reflecting changes in the collagen fiber lamellae direction relative to the EVLP. Spectral absorption curves, LD and DR obtained for Ponceau SS-stained corneas complement the information provided by the birefringence analyses, suggesting higher crystallinity and packing of the NOD stroma collagen fibers in comparison to the control.

Vidal & Mello (1970), studying dichroism spectral curves from tendon extracellular matrix stained with Toluidine Blue pH 4.0, observed that it showed  $A_{PA} < A_{PE}$ . The authors noted that the Toluidine Blue molecule, bind along their long axis by unipoint attachment of the quinoneimine group containing resonant electrons (the molecule must be considered to be an oscillating dipole),

perpendicular to the substrate (glycosaminoglycans), which is parallel to the long axis of the collagen fibers (Vidal & Mello, 1970). In the present study, birefringence reduction observed after treatment with hyaluronidase and negative LD (because  $A_{PA} < A_{PE}$ ) obtained for Toluidine Blue-stained stroma allows for deduction that, in the mouse cornea, glycosaminoglycan chains of PGs also were parallel to the long axis of the collagen fibers (Vidal, 1963; Vidal & Mello, 1970; Mello & Vidal 1973). Since in the present study, fixed and sectioned material were used, this finding reflects a condition of statistical nature, which *in vivo* can to vary due to the highly flexible adaptation of glycosaminoglycan chains to the extracellular matrix metabolism and the functional state of the structure.

Spectral absorption curves obtained for the Toluidine Blue-stained cornea (non-treated with hyaluronidase) showed no differences concerning the absorption peaks ( $A_{PA}$  and  $A_{PE}$ ) of the NOD and BALB/c corneal stroma. The present results are not suggestive of different stacking patterns for the dye molecules as a function of differences in glycosaminoglycan aggregation provoked by diabetes.

In conclusion, the present study contributes to the literature with quantitative data regarding corneal birefringence and LD, revealing that diabetes was capable of altering the OR associated with intrinsic birefringence (crystallinity) and form birefringence (packing) in corneal stroma collagen fibers of NOD mice. However, diabetes does not affect the spatial organization of the stroma PGs. It is possible to speculate that molecular alterations in the corneal stroma could compromise the biomechanics and transparency of the cornea, prejudicing its refractive function and consequently the visual acuity of the individual.

## 5. Acknowledgments

This study was supported by the Brazilian National Research and Development Council (CNPq) (Proc. 04102/2003-0), the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) (Proc. 2003/04597-0) and the Brazilian Research and Teaching Foundation (CAPES).

## 6. References

- Ahmed, N. (2005). Advanced glycation endproducts – role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 67, 3-21.
- Aldrovani, M., Mello, M.L.S., Guaraldo, A.M.A., & Vidal, B.C. (2006). Ordered aggregational state and molecular order in tendon collagen bundles of non-obese diabetic mice. *Submitted for publication*.
- Andreassen, T.T., Oxlund, H., & Danielsen, C.C. (1988). The influence of non-enzymatic glycosylation and formation of fluorescent reaction products on the mechanical properties of rat tail tendons. *Connective Tissue Research*, 17, 1-9.
- Bailey, A.J., Paul, R.G., & Knott, L. (1998). Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms of Ageing and Development*, 106, 1-56.
- Bennett, H.S. (1967). In: Hafner Publishing Company (Ed), *McClung's Handbook of Microscopical Technique* (pp. 591-677). New York.

- Beydaghyan, G., Kaminska, K., Brown, T., Robbie, K. (2004). Enhanced birefringence in vacuum evaporated silicon thin films. *Applied Optics*, 28, 5343-5349.
- Bloss, F.D. (1961). *An Introduction to the Methods of Optical Crystallography*. Watson, NY: Holt, 1961.
- Born, M., & Wolf, E. (1980). *Principles of Optics*. Pergamon Press, London.
- Bueno, J.M., & Jaronski, J.W. (2001). Spatially resolved polarization properties for in vitro corneas. *Ophthalmic & Physiological Optics*, 21, 384-392.
- Bueno, J.M., & Vargas-Martin, F. (2002). Measurements of the corneal birefringence with a liquid-crystal imaging polariscope. *Applied Optics*, 41, 116-124.
- Chakravarti, S., Magnuson, T., Lass, J.H., Jepsen, K. J., Lamantia, C., & Carroll, H. (1998). Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *The Journal of Cell Biology*, 141, 1277-1285.
- Closs P.A.C., & Christgau S. (2002). Non-enzymatic covalent modifications of proteins: mechanisms, physiological consequences and clinical applications. *Matrix Biology*, 21, 39-52.
- Colucci, F., Bergman, M.L., Penha-Gonçalves, C., Cilio, C.R., & Holmberg, D. (1997). Apoptosis resistance of non-obese peripheral lymphocytes linked to the Idd 5 diabetes susceptibility region. *PNAS*, 94, 8670-8674.
- Cornelissen, J.J.L.M., Fisher, M., Sommerdichijk, N.A.J.M., & Nolte, R.J.M. (1998). Helical superstructures from charged poly(styrene)-poly(isocyanodipeptide) block copolymers. *Science*, 280, 183-193.
- Farrel, R.A. (1994). Corneal transparency. In: D.M. Albert, & F.A. Jakobiec (Eds.), *Principle and Practice of Ophthalmology* (pp.64-81). London.

- Farrel, R.A., Freund, D.E., & McCally, R.L. (1999). Polarized light propagation in corneal lamellae. *Journal of Refractive Surgery*, 15, 700-705.
- Geday, M.A., Kaminsky, W., Lewis, J.G., & Glazer, A.M. (2000). Images of absolute retardance  $L$  center dot  $\Delta n$ , using the rotating polarizer method. *Journal of Microscopy*, 198, 1-9.
- Giraud-Guille, M.M. (1996). Twisted liquid crystalline supramolecular arrangements in morphogenesis. *International Review of Cytology*, 166, 59-101.
- Ha, N.Y., Han, S.H., Jeon, D.W., Jung, C.S., Park, B., Takezoe, H., & Wu, J.W. (2005). Analysis of surface second-harmonic generation by orientational distribution function in a chiral polymers film. *Physical Review: E, statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 72, 036601-1036601.
- Hadley, J.C., Meek, K.M., & Malik, N.S. (1998). Glycation changes the charge distribution of type I collagen fibers. *Glycoconjugate Journal*, 15, 835-840.
- Hwang, I.K., & Lee, Y.J. (2003). Birefringence induced by irregular structure in photonic crystal fibers. *Optics Express*, 11, 2799-2806.
- Jackson, D.S., & Bentley, J.P. (1968). Collagen-glycosaminoglycans interactions. In: B.S. Gould (Ed), *Treatise on Collagen* (pp.189-211). New York: Academic Press.
- Jaronski, J.W., & Kasprzak, H.T. (2003). Linear birefringence measurements of the *in vitro* human cornea. *Ophthalmic & Physiological Optics*, 23, 361-369.
- Kiernan, J.A. (1990). Histological and histochemical methods: theory and practice (pp.150). Oxford: Pergamom Press.
- Kim, B.M., Eichler, J., Reiser, K.M., Rubenchik, A.M., & Silva, L.B. (2000). Collagen structure and non-linear susceptibility: effects of heat, glycation, and enzymatic

- cleavage on second harmonic signal intensity. *Lasers in Surgery and Medicine*, 27, 329-335.
- Klyce, S.D., & Beuerman, R.W. (1988). Structure and function of the cornea. In: H.E. Kaufman, B.A. Barron, M.B. McDonald, & S.R. Waltman (Eds.). *The cornea* (pp. 3-54). New York: Churchill Livingstone.
- Komai, Y., Ushiki, T. (1991). The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 32, 2244-2258.
- Lison, L. (1960). *Histochimie et Cytochimie Animales: Principes et Methodes*. Gauthier-Villar (pp. 239-294). Paris.
- Louis-Dorr, V., Naoun, K., Allé, P., Benoit, A.N., & Raspiller, A. (2004). Linear dichroism of the cornea. *Applied Optics*, 43, 1515-2521.
- Maitland, D.J., & Walsh, J.T. (1997). Quantitative measurements of linear birefringence during heating of native collagen. *Lasers in Surgery and Medicine*, 20, 310-318.
- Malik, N.S., Moss, S.J., Ahmed, N., Furth, A.J., Wall, R.S., & Meek, K.M. (1992). Ageing of the human corneal stroma: structural and biochemical changes. *Biochemical Biophysical Acta*, 1138, 222-228.
- Malik, N.S., & Meek, K.M. (1994). The inhibition of sugar induced structural alterations in collagen by aspirin and other compounds. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 199, 683-686.
- Maurice, D.M. (1957). The structure and transparency of the corneal stroma. *Journal of Physiology*, 136, 263-286.

- Maurice, D.M. (1984). The cornea and sclera. In: H. Davison (Ed.), *The Eye* (pp. 1-158). New York: Academic Press.
- Meek, K.M., & Fullwood, N.J. (2001). Corneal and scleral collagens – a microscopist's perspective. *Micron*, 32, 261-272.
- Mello, M.L.S., & Vidal, B.C. (1973). Anisotropic properties of toluidine blue-stained collagen. *Annales d'histochimie*, 18, 103-122.
- Mentink, C.J.A.L., Hendriks, M., Levels, A.A.G., & Wolffenbuttel, B.H.R. (2002). Glucose-mediated cross-linking of collagen in rat tendon and skin. *Clinica Chimica Acta*, 321, 69-76.
- Michelacci, Y.M. (2003). Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36, 1037-1046.
- Montarou, C.C., & Gaylord, T.K. (2004). Two-wave-plate compensator method for single-point retardation measurements. *Applied Optics*, 43, 857-878.
- Newton, R.H., & Meek, K.M. (1998). The integration of the corneal and limbal fibrils in the human eye. *Biophysical Journal*, 75, 2508-2512.
- Oriel, P.J., & Schellman, J.A. (1966). Studies of the birefringence dispersion of polypeptides and proteins. *Biopolymers*, 4, 469-494.
- Pena, A.M., Boulesteix, T., Dartigalongue, T., & Schane-Klein, M.C. (2005). Chiroptical effects in second harmonic signal of collagen I and IV. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 10314-10322.
- Quantock, A.J., Meek, K.M., Ridgeway, A.E.A., Bron, A.J., & Thonar, E.J.M.A. (1990). Macular corneal dystrophy: reduction in both corneal thickness and collagen interfibrillar spacing. *Current Eye Research*, 9, 393-398.



- Reddy, G.K., Stheno-Bittel, L., & Enwemeka, S. (2002). Glycation-induced matrix stability in the rabbit Achilles tendon. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 399, 174-180.
- Reiser, K.M., Amigable, M.A., & Last, J.A. (1992). Non-enzymatic glycosylation of type I collagen. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 24207-24216.
- Roth, S., & Freund, I. (1982). Second harmonic generation and orientational order in connective tissue: a mosaic model for fibril orientational ordering in rat-tail tendon. *Journal of Applied Crystallography*, 15, 72-78.
- Sady, C., Khosrof, S., & Nagaraj, R. (1995). Advanced maillard reaction and crosslinking of corneal collagen in diabetes. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 214, 793-797.
- Savenkoy, S.M., Sydurok, O.L. (2005). Conditions for polarization elements to be dichroic and birefringent. *Journal of the Optical Society of America*, 7, 1447-1452.
- Schnider, A.M., & Kohn, R.R. (1982). Effects of age and diabetes mellitus on the solubility of collagen from human skin, tracheal cartilage and dura mater. *Experimental Gerontology*, 17, 185-194.
- Silva, D.F.T., Vidal, B.C., Zzell, D.M., Zorn, T.M.T., Núñez, S.C., & Ribeiro, M.S. (2006). Collagen birefringence in skin repair in response to red polarized-laser therapy. *Journal of Biomedical Optics*, 11(2), 024002.
- Sinex, F.M. (1968). The role of collagen in aging. In: B.S. Gould (Ed.), *Treatise on collagen* (pp. 409-448). New York: Acad. Press.
- Stein, R.S., & Norris, H. (1956). The X-ray diffraction, birefringence and infrared dichroism of stretched polyethylene. *Journal of Polymer Sciences*, 21, 381-396.

- Tanaka, S., Avigad, G., Brodsky, B., & Eikenberry, E.F. (1988). Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *Molecular Biology*, 203, 495-505.
- van Blokland, G.J., & Verhelst, S.C. (1987). Corneal polarization in the living human eye explained with a biaxial model. *J. Opt. Soc. Am A*, 4, 82-90
- Vidal, B.C. (1963). Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. *Protoplasma*, 56, 529-536.
- Vidal, B.C. (1964). The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of collagen. *Protoplasma*, 59, 472-479.
- Vidal, B.C. (1966). Macromolecular disorientation in detached tendons. *Protoplasma*, 62, 121-132.
- Vidal, B.C. (1970). Interferometric and histochemical investigation on collagen bundles: refractive indices and dry masses prior and after staining with orange G. *Annales d'histochimie*, 15, 191-205.
- Vidal, B.C. (2003). Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron*, 34, 423-432.
- Vidal, B.C., & Mello, M.L.S. (1970). Absorption spectral curves of dichroism on collagen bundles. *Histochemie*, 23, 176-179.
- Vidal, B.C., Mello, M.L.S., & Pimentel, E.R. (1982). Polarization microscopy and microspectrophotometry of sirius red, picrosirius and chlorantine fast red aggregates and of their complexes with collagen. *Histochemical Journal*, 14, 857-878.
- Vidal, B.C., & Mello, M.L.S. (1984). Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. *Cellular and Molecular Biology*, 30, 195-204

- Vidal, B.C., & Mello, M.L.S. (2005). Supramolecular order following binding of the dichroic birefringent sulfonic dye ponceau SS to collagen fibers. *Biopolymers*, 78, 121-128.
- Vidal, B.C., Volpe, P.L.O. (2005). Differential scanning calorimetry and optical properties of collagen-dichroic azo ponceau SS complexes. *Brazilian Journal morphological Science*, 22, 149-153.
- Whittaker, P., Bouhner, D.R., Perkins, D.G., & Canhan, P.B. (1987). Quantitative structural analysis of collagen in chordae tendinae and its relation to floppy mitral valves and proteoglycan infiltration. *British Heart Journal*, 57, 264-269.
- Wied, G.L., 1966. In: *Introduction to quantitative cytochemistry* (pp. 557-600). New York: Academic Press.
- Yun, JH., Kuboyama, K., Chibata, T., & Ouzigawa, T. (2006). Crystallization temperature dependence of interference color and morphology in poly(trimethylene terephthalate) spherulite. *Polymer*, 47, 4831-4838.

**Table 1**

OR values (nm) for whole and sectioned (8  $\mu\text{m}$ ) corneas imbibed in water ( $n_D = 1.333$ ) and, subsequently, in pure glycerol ( $n_D = 1.471$ ).

Mice	Water		Pure glycerol		
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
<b>Whole corneas</b>					
<i>NOD</i>	13.473	2.720	5.959	1.558	
<i>BALB/c</i>	9.811	2.111	3.908	0.890	
<b>Cornea sections (8 <math>\mu\text{m}</math>)</b>					
<i>NOD</i>	22.153	2.463	9.241	0.665	
<i>NOD H</i>	16.245 *	1.391	-----	-----	
<i>BALB/c</i>	19.140	2.322	7.690	0.960	
<i>BALB/c H</i>	13.501 *	1.157	-----	-----	

\* $P_{0.000}$  level compared to the corresponding group non-treated with hyaluronidase.

Statistical test: ANOVA. H = treated with hyaluronidase;  $\bar{X}$  = arithmetic mean; SD = standard deviation. Number of measurements = 150.

**Table 2**

Maximum parallel ( $A_{PA}$ ) and perpendicular ( $A_{PE}$ ) absorption peaks for NOD and BALB/c corneas stained with Ponceau SS and Toluidine Blue.

Mice	Parameter	Ponceau SS	Toluidine Blue
		( $\lambda = 520$ nm)	( $\lambda = 540$ nm)
<b>NOD</b>			
	$A_{PA}$	1.013	0.562
	$A_{PE}$	0.538	0.581
	$LD^1$	0.475*	-0.019
	$DR^2$	1.882*	0.967
<b>BALB/c</b>			
	$A_{PA}$	0.570	0.566
	$A_{PE}$	0.482	0.583
	$LD^1$	0.088*	-0.017
	$DR^2$	1.182*	0.970

The  $A_{PA}$  and  $A_{PE}$  were determined microspectrophotometrically.

$^1LD = A_{PA} - A_{PE}$ .  $^2DR = A_{PA}/A_{PE}$ . Number of measurements = 10

corneas of each group, 3 sections each. Statistical test: Mann-

Whitney. \*Statistically significant differences ( $P_{0.01}$  level).

## Figure captions

**Figure 1.** Schematic diagram of a polarized light microscope.

**Figure 2.** Schematic diagram of a scanning microspectrophotometer.

**Figure 3.** A, C and E = BALB/c corneas; B, D and F = NOD corneas. A and B = whole corneas analyzed by polarized light microscopy. C-F = cornea sections analyzed by polarized light. C-D = corneal axis oriented at  $45^\circ$  relative to the PPL. E-F = corneal axis perpendicular to the PPL.

**Figure 4.** Form birefringence curves for NOD and BALB/c corneas.

**Figure 5.** Spectral absorption curves for NOD and BALB/c corneas stained with Ponceau SS (A) and Toluidine Blue (B).

**Figure 6.** A, C and E = BALB/c corneas; B, D and F = NOD corneas. A-B = Ponceau SS-stained corneal collagen fibers. C-D = Toluidine Blue-stained corneal stroma. E-F = Toluidine Blue-stained corneal stroma, after treatment with hyaluronidase. Full size =  $4.500 \mu\text{m}$ .

Figure 1

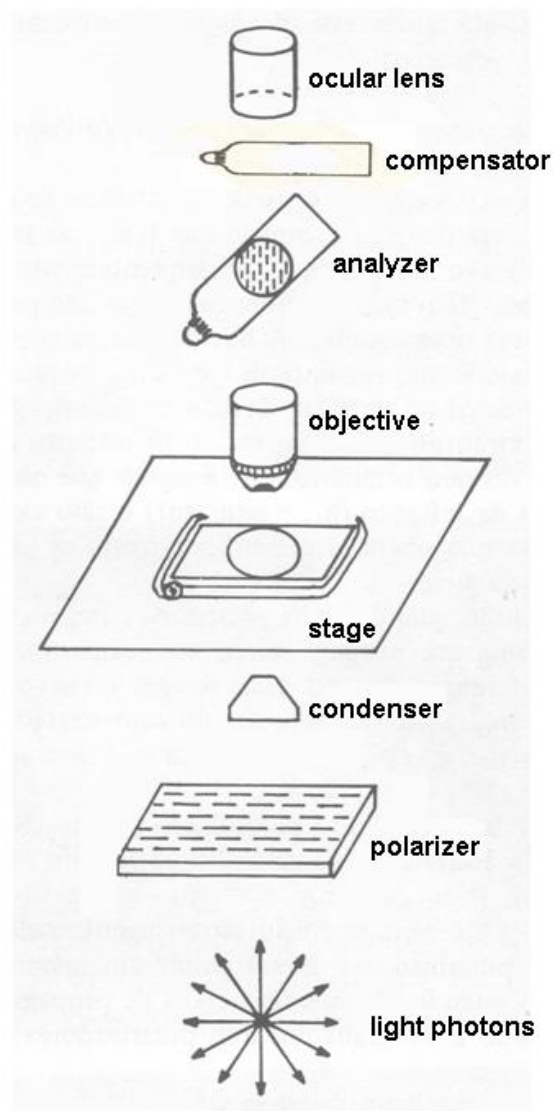


Figure 2

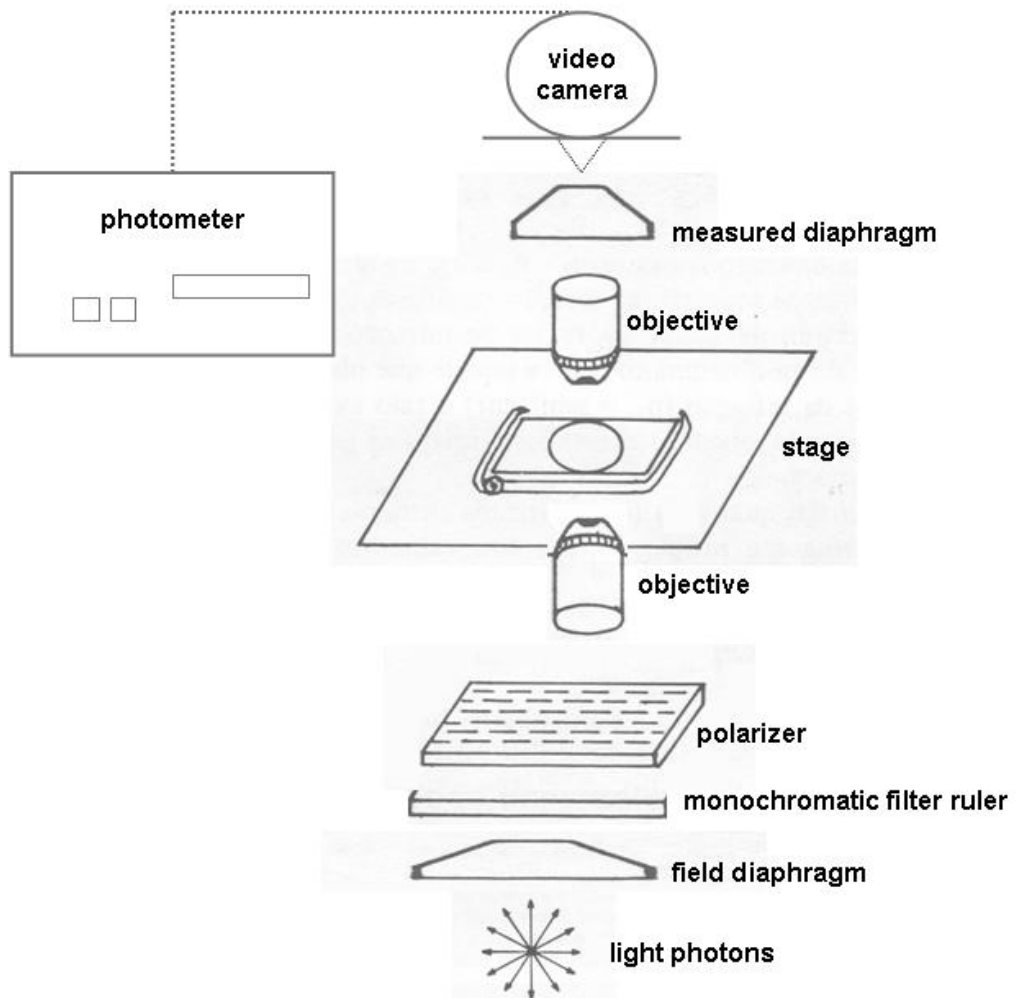




Figure 3

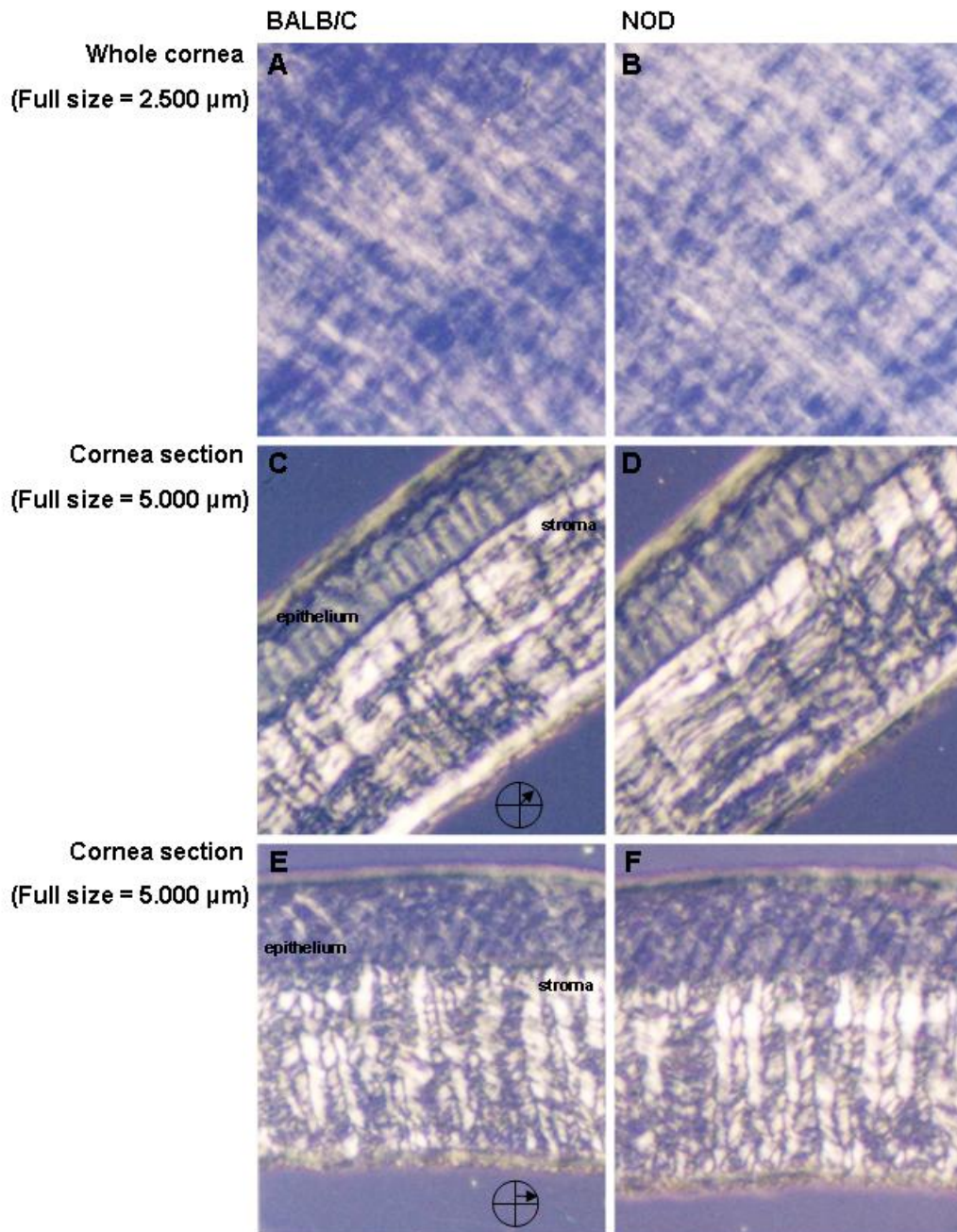


Figure 4

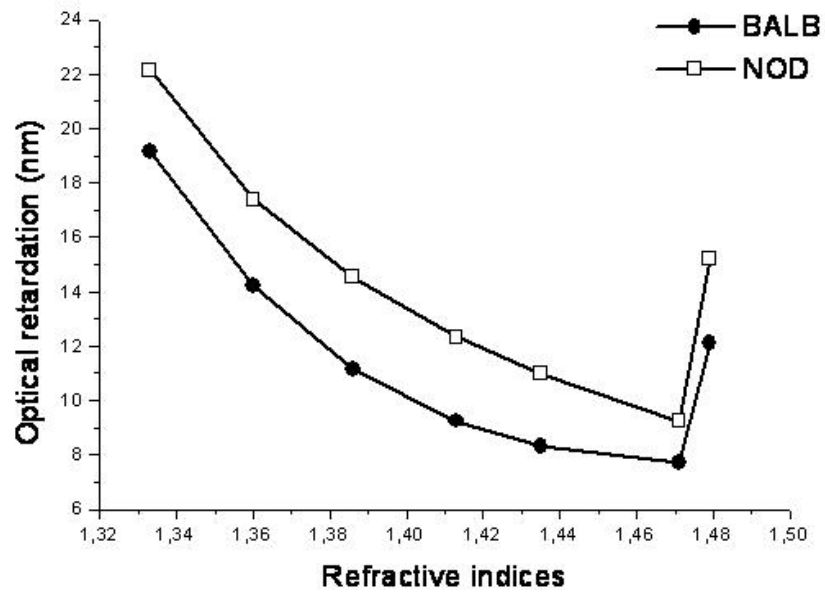


Figure 5

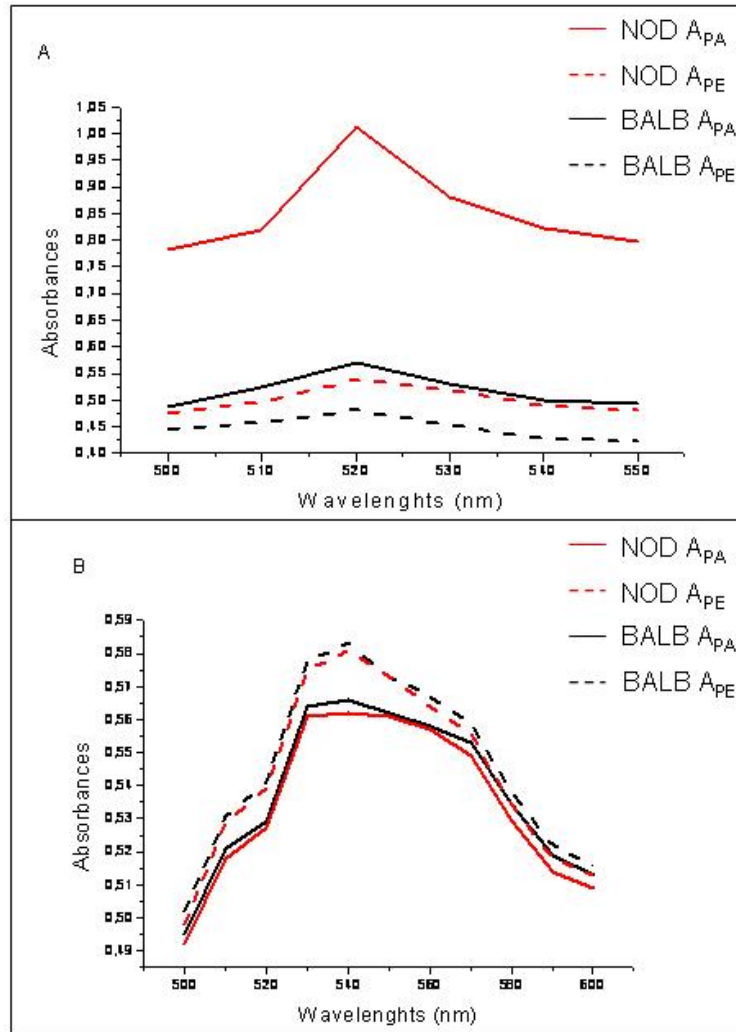
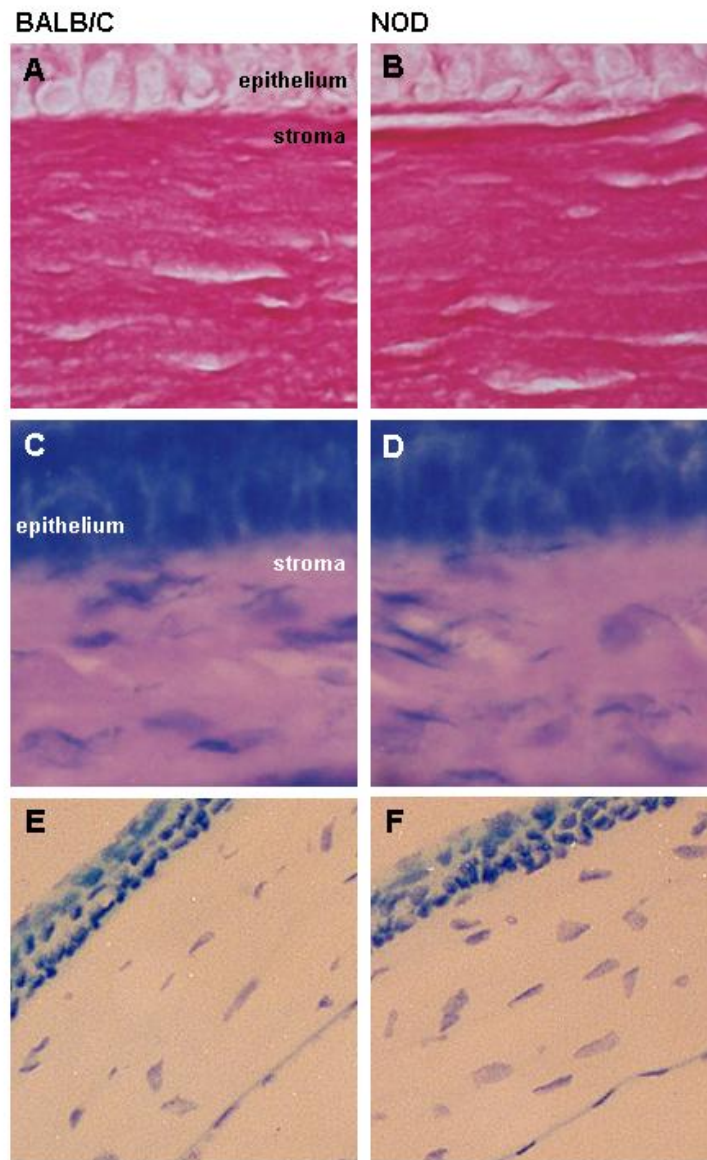


Figure 6



## **ARTIGO II**

---

## **Fluorescence, birefringence and confocal microscopy of the abdominal aorta from nonobese diabetic (NOD) mice**

Marcela Aldrovani<sup>a, \*</sup>, Ana Maria Aparecida Guaraldo<sup>b</sup>, and Benedicto de Campos Vidal<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Department of Cell Biology, Institute of Biology; <sup>b</sup>Multidisciplinary Center of Biological Investigation, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

\*Corresponding author: Department of Cell Biology, Institute of Biology, State University of Campinas – UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13.083-970 Campinas, SP, Brazil. Tel.: +55 19 37886123; fax: +55 19 37886111.

E-mail address: [m\\_ald@unicamp.br](mailto:m_ald@unicamp.br) (M. Aldrovani)

**Running title:** Fluorescence and birefringence analyses of diabetic aortas

## Summary

In this study, nonenzymatic glycosylation was assessed in aorta extracellular matrix from nonobese diabetic (NOD) mice, using nitroblue tetrazolium (NBT). Molecular and structural changes were investigated in elastic lamellae and collagen fibers of diabetic mice aortas after staining with dansyl chloride and anilinonaphthalene sulfonate (ANS). Alterations in arterial autofluorescence and birefringence of collagen fibers were investigated in unstained aortas. Proliferation of smooth muscle cell was also investigated by Feulgen reaction staining assessed by confocal microscopy and image analysis. Assessment of nonenzymatic glycosylation demonstrated glycosylation products in the aorta extracellular matrix of NOD mice. Elastic lamellae and collagen fibers from NOD mouse aortas presented less intense fluorescence after staining with dansyl chloride and ANS when compared to aortas of control non-diabetic mice. However unstained NOD aortas showed more intense autofluorescence when compared to controls. Birefringence analysis suggests alterations in the higher molecular packing of the arterial collagen fibers in NOD aortas. In aortas stained by Feulgen reaction no evidence of smooth muscle cells proliferation was observed in diabetic aortas.

**KEY WORDS:** aorta; birefringence; collagen fibers; confocal microscopy; elastic lamellae; fluorescence microscopy; nonenzymatic glycosylation.

## Introduction

Diabetes mellitus is a chronic disorder related to deficient insulin production or to metabolic defects in response to insulin in peripheral tissues (Closs and Christgau, 2002; Ahmed, 2005). Among diabetic complications, special attention has been attributed to those related to the vascular system. Many studies have suggested that biochemical abnormalities induced by hyperglycemia, including nonenzymatic glycosylation, are associated with pathogenesis of vascular disturbances during diabetes (Cerami et al., 1985; Vlassara, 1994; Bucala and Vlassara, 1995; Berg et al., 1997; Higashi et al., 1997; Kosuya et al., 1999; Massi-Benedeti and Frederici, 1999; Ross, 1999; Ruef et al., 2000).

Nonenzymatic glycosylation promotes the condensation of the glucose aldehyde group with free amines from one or more proteins to form a Schiff base that gives rise to an Amadori product (Andreassen et al., 1988; Bailey et al., 1998; Mentink et al., 2002; Ahmed, 2005). The Amadori product undergoes rearrangements to yield products known as advanced glycosylation end-products (AGEs) (Andreassen et al., 1988; Bailey et al., 1998; Mentink et al., 2002; Ahmed 2005). Nonenzymatic glycosylation occurs more effectively in arterial elastin and collagen (Schnider and Kohn, 1982; Monnier, 1989; Rasmussen and Ledet, 1993; Meng et al., 1996; Paul and Bailey, 1996). Supramolecular elastin and collagen improve viscosity, elasticity and enhance the biomechanics of the arterial pathway, contributing to the regulation of blood flow (Stehbens, 1996). Additionally, elastin



and collagen establish the basis for the extracellular matrix (ECM), allowing it to act as a signal transducer by modulating cellular biosynthetic activity and proliferative capability (Vidal, 1994; Bishara et al., 2002).

The principal contribution of this study was to perform an *in situ* investigation using dansyl chloride and ANS for elastin and collagen identification (Laurence, 1966; Gosline, 1976; Vidal, 1980; Timberlake et al., 2002; Braga-Vilela and Vidal, 2006) and, based on optical properties, determine the capability of diabetes to elicit structural and molecular changes in abdominal aorta elastic lamellae and collagen fibers in nonobese diabetic (NOD) mice. Smooth muscle cell (SMC) proliferation was also investigated, using the Feulgen reaction and assessed using confocal microscopy and image analysis.

## **Material and Methods**

### **Animals**

All the protocols involving animal care and use were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the State University of Campinas and met the Guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Ten female NOD/Uni mice (16 weeks old; 28 days of diabetes) and 15 female BALB/c/Uni mice (healthy controls) of the same age were obtained from the

Multidisciplinary Center of Biological Investigation (CEMIB) of the State University of Campinas (Brazil). Glycemia levels in NOD mice were measured approximately 6 hours before they were killed. All the NOD mice presented “HI” glucose levels (chronic hyperglycemia).

The mice were killed by decapitation, and their abdominal aortas were removed. The aortas were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.2 for 24 h, processed by routine protocols for embedding in Histosec<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt, Germany). 10 µm thick sections were cut by microtome.

### **Assessment of nonenzymatic glycosylation**

Nonenzymatic glycosylation was assessed by scanning microspectrophotometry using nitroblue tetrazolium (NBT) method, as described by Fitzgerald et al., (1999), Seidler and Yeargans (2002), and Konova et al., (2004). Some BALB/c aortas were incubated with 1.0 M glucose in phosphate buffer pH 7.4 for induction of nonenzymatic glycosylation *in vitro* (Andreassen et al., 1988); processed and sectioned as described above, and used as standard to verify the efficiency of the nonenzymatic glycosylation in NOD aortas.

Sections (five aortas from each group, ten sections each) were analyzed in a Zeiss automatic scanning microspectrophotometer (Oberkochen, Germany) equipped with a Planapo 40x objective, optovar 2, measured diaphragm diameter of 0.1 mm, field diaphragm diameter of 0.2 mm, 100-W/12-V lamp, and

wavelengths from 365 and 530 nm (Garner et al., 2000; Seidler and Yeargans, 2002) obtained with an Schott monochromator filter ruler (Oberkochen, Germany).

## **Histochemical procedures**

### **Dansyl chloride**

Histological sections were washed in 95% ethanol and stained with dansyl chloride (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), as described previously by Vidal (1980), and Braga-Vilela and Vidal (2006).

### **1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS)**

Histological sections were stained with 0.1% ANS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), as described previously by Vidal (1978), and Braga-Vilela and Vidal (2006).

### **Feulgen reaction**

Sections were hydrolyzed in 4 M HCl for 90 min at 25°C and then rapidly rinsed with cold 0.1 M HCl to stop the hydrolysis. The hydrolyzed material was treated with Schiff reagent diluted in sulfurous water (1:20, v/v) for 40 min in the dark, rinsed three times (5 min each) in sulfurous water and once in distilled water, air dried, and mounted with a coverslip in Nujol mineral oil (Schering-Plough S.A., RJ, Brazil) ( $n_D = 1.479$ ) after the method of Mello (1997).

## **Analysis of fluorescence labeling**

Sections stained with dansyl chloride and ANS were examined using a Zeiss Axiophot microscope (Oberkochen/München, Germany) equipped for epifluorescence with an HBO-100W stabilized mercury lamp as the light source. The filters used for fluorescence were: G 365 (BP exciting filter transmitting a wavelength from 546/547 nm), an FT 395 chromatic splitter, an LP 420 barrier filter (filter set 2). Unstained sections were mounted with a coverslip in Nujol mineral oil, and examined to detect natural autofluorescence.

## **Birefringence optical retardation (OR) analysis**

Histological sections from unstained aortas (10 mice from each group, one section each) were left to soak for 1 h in water ( $n_D = 1.333$ ) for birefringence OR analysis of arterial collagen fibers after Vidal (1964), and Whittaker et al., (1987). 50 OR measurements were made (5 measurements per section), positioning the long axis of the collagen fibers at  $45^\circ$  relative to the plane of polarized light (PPL). A Zeiss Pol-microscope (Oberkochen, Germany) equipped with a 40x objective and monochromatic light (wavelength from 546 nm) was used.

## **Confocal laser scanning microscopy**

Aortas subjected to the Feulgen reaction were analyzed using a Zeiss LSM 510 META confocal laser scanning microscope equipped with a 40x Plan-neofluar objective. Channels – BP 500-530 IR and LP560, and wavelengths from 488 and 543 nm were used for simultaneous detection of SMC nuclei, elastic lamellae and collagen fibers. The images obtained were digitalized, analyzed and reconstituted in 3-D using Zeiss LSM Image Browser software.

All analysis that required confocal microscopy was performed at the Laboratory of Parasitology and Malacology at the Butantan Institute (São Paulo, SP, Brazil).

## **Video-image analysis**

Feulgen-stained SMC nuclei were counted (10 aortas from each mice) using Olympus equipment (Olympus American Inc., NY, USA) and Image-Pro-Plus 5.01 Media Cybernetic software.

## Statistical analysis

Data obtained from each sample were compared using Minitab 12™ software (State College, PA, USA), expressed as mean ( $\bar{X}$ ) and standard deviation (SD) (ANOVA), and were considered statistically significant at P values < 0.05.

## Results and Discussion

The NBT procedure used in this study is based on the reducing ability of fructosamine (glycosylation products) in alkaline solution (Konova et al., 2004). No statistically significant difference (Table 1, P=0.07) was observed between absorbance values (wavelength from 530 and 365 nm) obtained for NOD and glycosylated *in vitro* aortas stained with NBT. NOD and glycosylated *in vitro* aortas showed higher absorbance values than control (BALB/c) (Table 1, P<0.05). These results suggest that diabetes induced Amadori products and AGEs formation in aorta ECM from NOD mice. Additionally, absorbances observed in BALB/c aortas suggest the presence of low concentrations of Amadori products and AGEs in the healthy ECM. Since elastin and collagen are biological activity half-life macromolecules (turnover ratio is slow); they are susceptible to the slow process of glycosylation related to the aging of connective tissue (Hay, 1981; Konova et al., 2004).

Dansyl chloride is specific for microfluorometric determination of  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> and  $\epsilon$ -NH<sub>3</sub> (Rosselet and Ruch, 1968). In connective tissue rich structures, dansyl chloride staining has been used as a fluorescent method for elastin and collagen identification (Timberlake et al., 2002; Braga-Vilela and Vidal, 2006). ANS staining has been described as a method for detecting nonpolar molecular sites, as long as these sites are extensive and sterically available for probe binding (Stryer, 1965). ANS has been widely used in histochemistry for the identification of elastin and collagen by fluorometric measurements (Laurence, 1966; Gosline, 1976; Vidal, 1980; Braga-Vilela and Vidal, 2006).

Elastic lamellae and collagen fibers revealed by staining with dansyl chloride and ANS showed blue fluorescence both in NOD aortas and in controls (Fig. 1 a-d). NOD aorta elastic lamellae were less (Fig 1 b and d) fluorescent than elastic lamellae from control aortas (Fig. 1 b and c). Given that during the nonenzymatic glycosylation process the condensation of ECM protein free amines with glucose aldehyde occurs (Andreassen et al., 1988; Mentink et al., 2002), it would be expected that NOD mice elastin and collagen would present fewer free amines available for binding with dansyl chloride.

Two possibilities can be considered to explain the results observed in aortas stained with ANS: (1) glycosylation products could sterically block or even diminish tissue hydrophobic sites available for probe binding; (2) glucose available in the tissue could induce conformational changes at ANS-binding sites. Although ANS interacts with lipid components; the possibility that lipid changes, commonly

observed in diabetes, were responsible for the fluorescence differences detected in this study can be discounted, since lipids are soluble in the xylene used in the histological procedures and they would therefore be eluted.

When unstained aortas were analyzed using fluorescence microscopy using filter transmitting a wavelength from 546/547 nm, they showed autofluorescence that was more intense in NOD aortas than in control (Fig. 1 e-f). This result suggests that NOD aortas possess a greater quantity of fluorophores than control. Previous studies have demonstrated that several AGEs present fluorogenic properties (Baydanoff et al., 1996; Tomizawa et al., 1993; Mironova et al., 2005) and this explains the more intense autofluorescence in diabetic aortas.

Birefringence OR measurements performed on unstained sections showed that collagen fibers from NOD aortas presented higher OR values when compared to control collagen fibers ( $\bar{X} = 14.100$ , SD = 2.111 for NOD;  $\bar{X} = 9.302$ , SD = 2.111 for control; P=0.02). Increased OR values in NOD mice may be reflecting changes in molecular packing of the collagen fibers, as reported by Tanaka et al., (1988), Malik et al., (1992) Malik and Meek (1994), and Kim et al., (2000).

Confocal microscopy of aortas subjected to the fluorescent Feulgen reaction permitted their 3-D reconstitution (Fig. 2 a-b). When the samples were illuminated with wavelengths from 543 nm, elastic lamellae and collagen fibers showing clear autofluorescence were observed (Fig. 2 c-d). Using wavelengths from 488 nm, cell nuclei showing red fluorescence that was induced by the binding of the Schiff reagent to nuclear DNA were observed (Fig. 2 e-f). No evidence of SMC



proliferation was observed in the NOD aortas analyzed by confocal microscopy and image analysis ( $P=0.09$ ). However, it has been reported that incubation with AGE-BSA and low regulation of the aldose-reductase gene in the sorbitol pathway in diabetes stimulates SMC mitotic capacity (Higashi et al., 1997; Kasuya et al., 1999; Ruef et al., 2000).

The results of this study demonstrated that diabetes was capable of altering aorta ECM proteins, especially elastin and collagen. Changes in arterial elastin and collagen are potentially capable of altering the functionality of the aortic pathway.

## **Acknowledgements**

Authors would like to thank Dra. Toshie Kawano and Mr. Alexsander Seixas de Souza from the Laboratory of Parasitology and Malacology at Butantan Institute (São Paulo, SP, Brazil), for consenting to the use of the Zeiss LSM 510 META confocal laser scanning microscope. This study was financed by the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES), “Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico” (CNPq) (Proc. 04102/2003-0) and “Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP) (Proc. 2003/04597-0).

## References

- Ahmed N. Advanced glycation endproducts – role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Practice* 2005; 67:3-21.
- Andreassen TT, Oxlund H, Danielsen CC. The influence of non-enzymatic glycosylation and formation of fluorescent reaction products on the mechanical properties of rat tail tendons. *Connect. Tissue Res* 1988; 17:1-9.
- Bailey AJ, Paul RG, Knott L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechan Ageing Develop* 1998; 106:1–56.
- Baydanoff S, Konova E, Ivanova N. Determination of anti-AGE antibodies in human serum. *Glycoconjugated J* 1996; 13:335-39.
- Berg TJ, Bangsted HJ, Torjesen PA, Osterby R, Bucala R, Hanssen KF. Advanced glycation end-products in serum predict changes in the kidney morphology of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1997; 46:661-65.
- Bishara NB, Dunlop ME, Murphy TV, Darby IA, Irajanyagam MAS, Hill MA. Matrix protein glycation impairs agonist-induced intracellular  $Ca^{++}$  signaling in endothelial cells. *J Cell Physiol* 2002;198:80–92.
- Braga-Vilela AS, Vidal BC. Identification of elastic fibers and lamellae in porcine pericardium and aorta by confocal, fluorescence and polarized light microscopy. *Acta Histochem* 2006; 108(2):125-132.

Bucala R, Vlassara H. Advanced glycosylation end-products in diabetic renal and vascular disease. *Am J Kidney Dis* 1995; 26:875-88.

Cerami A, Vlassara H, Brownlee M. Protein glycosylation and the pathogenesis of atherosclerosis. *Metabolism* 1985; 34:37-42.

Closs PAC, Christgau S. Non-enzymatic covalent modifications of proteins: mechanisms, physiological consequences and clinical applications. *Matrix Biol* 2002; 21:39-52.

Fitzgerald C, Swearingin TA, Yeargans G, McWhorter D, Seidler NW. Non-enzymatic glycosylation (or glycation) and inhibition of the pig heart cytosolic aspartate aminotransferase by glyceraldehydes 3-phosphate. *J Enzyme Inhib* 2000;15(1)79-89.

Garner B, Shaw DC, Lindner RA, Carver JA, Truscott RJ. Non-oxidative modification of lens crystallins by kynurenine: a novel posttranslational protein modification with possible relevance to ageing and cataract. *Biochim Biophys Acta* 2000;296(5):1257-82

Gosline JM. The physical properties of elastic tissue. *Inter Rev Connective Tissue Res* 1976; 7:211-49.

Hay ED. Extracellular matrix. *J Cell Biol* 1981; 91(3):205-223.

Higashi T, Sano H, Saishoji T, Ikeda K, Jinnouchi Y, Kanzaki T, Morisake N, Rauvala H, Shichire M, Horiuchi S. The receptor for advanced glycation end-products mediates the chemotaxis of rabbit smooth muscle cells. *Diabetes* 1997; 46:463-72.

Kasuya Y, Ito M, Nakamura J, Hamada Y, Nakayama M, Chaya S, Komori T, Naruse K, Nakashima E, Kato K, Koh N, Hotta N. An aldose reductase inhibitor prevents the

- intimal thickening in coronary arteries of galactose-fed beagle dogs. *Diabetologia* 1999; 42:1404-09.
- Kim BM, Eichler J, Reiser KM, Rubenchik AM, Silva LB. Collagen structure and non-linear susceptibility: effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity. *Lasers Surg Med* 2000; 27:329-335.
- Konova E, Baydanoff S, Atanasova M, Velkova A. AGE-related changes in the glycation of human aortic elastin. *Exper Gerontol* 2004; 39:249-54.
- Laurence DJR. The interaction of calf thymus histones fractions in aqueous solution with 8-anilino-naphthalene-1-sulphonic acid. *Biochem J* 1966; 99:419-22.
- Malik NS, Moss SJ, Ahmed N, Furth AJ, Wall RS, Meek KM. Ageing of the human corneal stroma: structural and biochemical changes. *Biochem Biophys Acta* 1992; 1138:222-228.
- Malik NS, Meek KM. The inhibition of sugar induced structural alterations in collagen by aspirin and other compounds. *Biochem Biophys Res Comm* 1994; 199:683-686.
- Massi-Benedetti M, Federici MO. Cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: the role of hyperglycaemia. *Exp Clin Endocr Diabetes* 1999; 107:120-23.
- Mello MLS. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. *Braz J Genet* 1997;20:257-64.
- Mentink CJAL, Hendriks M, Levels AAG, Wolffenbuttel BHR. Glucose-mediated cross-linking of collagen in rat tendon and skin. *Clin Chim Acta* 2002; 321:69-76.
- Meng J, Sakata N, Takebayashi S, Asano T, Futata T, Araki N, Horiuchi S. Advanced glycation end-products of the Maillard reaction in aortic pepsin-insoluble and pepsin-soluble collagen from diabetic rats. *Diabetes* 1996; 45:1037-43.

- Mironova R, Niwa T, Handzhiyski Y, Sredovska A, Ivanov I. Evidence for non-enzymatic glycosylation of *Escherichia coli* chromosomal DNA. *Mol Microbiol* 2005; 55(6):1801-1811.
- Monnier VV. Maillard theory of ageing. In: Baynes JW, Monnier VM, editors. The Maillard reaction in aging, diabetes, and nutrition. New York: Alan R. Liss; 1989. p. 1-22.
- Paul RG, Bailey AJ. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. *Inter J Biochem Cell Biol* 1996; 28:1297-1310.
- Rasmussen LM, Ledet T. Aortic collagen alterations in human diabetes mellitus. Changes in basement membrane collagen content and in the susceptibility of total collagen to cyanogen bromide solubilization. *Diabetologia* 1993; 36:445-53.
- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *New Engl J Med* 1999; 340:115-26.
- Rosselet A, Ruch F. Cytofluorometric determination of lysine with dansylchloride. *J Histochem Cytochem* 1968;16:459-66.
- Ruef J, Liu SQ, Bode C, Tocchi M, Srivastava S, Runge MS, Bhatnagar A. Involvement of aldose reductase in vascular smooth muscle cell growth and lesion formation after arterial injury. *Arterosc Trombos Vasc Biol* 2000; 20:1745-52.
- Schnider AM, Kohn RR. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility of collagen from human skin, tracheal cartilage and dura mater. *Exp Geront* 1982; 17:185-94.
- Seidler NW, Yeargans GS. Effects of thermal denaturation on protein glycation. *Life Sciences* 2002;70:1789-1799.

- Stehbens WE. Structural and architectural changes during arterial development and the role of hemodynamics. *Acta Anat* 1996;157:261-274.
- Stryer L. The interaction of naphthalene dye with apomyoglobin – a fluorescent probe of non-polar binding sites. *J Mol Biol* 1965;13:482-95.
- Tanaka S, Avigad G, Brodsky B, Eikenberry EF. Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *Mol Biol* 1988; 203:495-505.
- Timberlake GT, Reddy GK, Stehno-Bittel L, Weber JF, Amslinger S, Givens RS. Photoactivated coumaryl-diaopyruvate fluorescent label for amine functional groups of tissues containing type I collagen. *Photochem Photobiol* 2002; 76:473-79.
- Tomizawa H, Yamazaki M, Kunika K, Itakura M, Yamashit K. Association of elastin glycation and calcium deposit in diabetic rat aorta. *Diabetes Res Clin* 1993; 19:1-8.
- Vidal BC. The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of collagen. *Protoplasma* 1964;59:472-79.
- Vidal BC. The use of the fluorescent probe 8-anilino-naphthalene sulfate (ANS) for collagen and elastin histochemistry. *J Histochem Cytochem* 1978; 26:196-201.
- Vidal BC. Aortas elastic and tendon collagen reactivity to 8-anilino-1-naphthalene sulphate (ANS) and dansyl choride. *Cell Mol Biol* 1980; 26:583-88.
- Vidal BC. Cell and extracellular matrix interaction: a feed back theory based on molecular order recognition-adhesion events. *Rev Fac Ciênc Médicas/UNICAMP* 1994;4:1-11.
- Vlassara H. Recent progress on the biological and clinical significance of advanced glycosilation endproducts. *J Lab Clin Med* 1994; 124:19-30.

Whittaker P, Bouhner DR, Perkins DG, Canham PB. Quantitative structural analysis of collagen in chordae tendinae and its relation to floppy mitral valves and proteoglycan infiltration. *Br Heart J* 1987;57:264-69.

**Table 1** – Absorption values for NOD, glycosylated *in vitro* and BALB/c aortas stained with NBT.

<i>Mice</i>	$\lambda = 365 \text{ nm}$		$\lambda = 530 \text{ nm}$	
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD
NOD	1.023	0.41	1.786	0.27
Glycosylated <i>in vitro</i>	1.086	0.68	1.817	0.36
BALB/c control	0.342*	0.21	0.402*	0.07

Number of measurements = 50 (5 aortas of each group, 10 sections each); statistical test: ANOVA; \*p<0.05 when compared to the NOD or glycosylated *in vitro* group.



## Legends of Figures

**Figure 1.** (a and b) aortas stained with dansyl chloride. (c and d) aortas stained with ANS. Elastic lamellae and collagen fibers evidenced by staining with dansyl chloride and ANS showed blue fluorescence that was less intense in NOD aortas (b and d) than control (a and c). (e and f) unstained aortas showed natural autofluorescence evidenced in blue and more intense in NOD aortas (f) than in control (e). Bars: (a and b) 35  $\mu\text{m}$ ; (c and d) 50  $\mu\text{m}$ ; (e and f) 20  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2.** (a-f) aortas subjected to Feulgen reaction and analyzed by confocal microscopy. (a, c, e) BALB/c aorta; (b, d, f) NOD aorta. Confocal microscopy permitted simultaneous detection of SMC nuclei, elastic lamellae and collagen fibers (a and b). When the samples were illuminated with wavelengths at 543 nm, only elastic lamellae and collagen fibers were observed, showing green autofluorescence (c and d). Using wavelengths at 488 nm, the cell nuclei presented red fluorescence that was induced by the binding of the Schiff reagent to nuclear DNA (e and f).

Figure 1

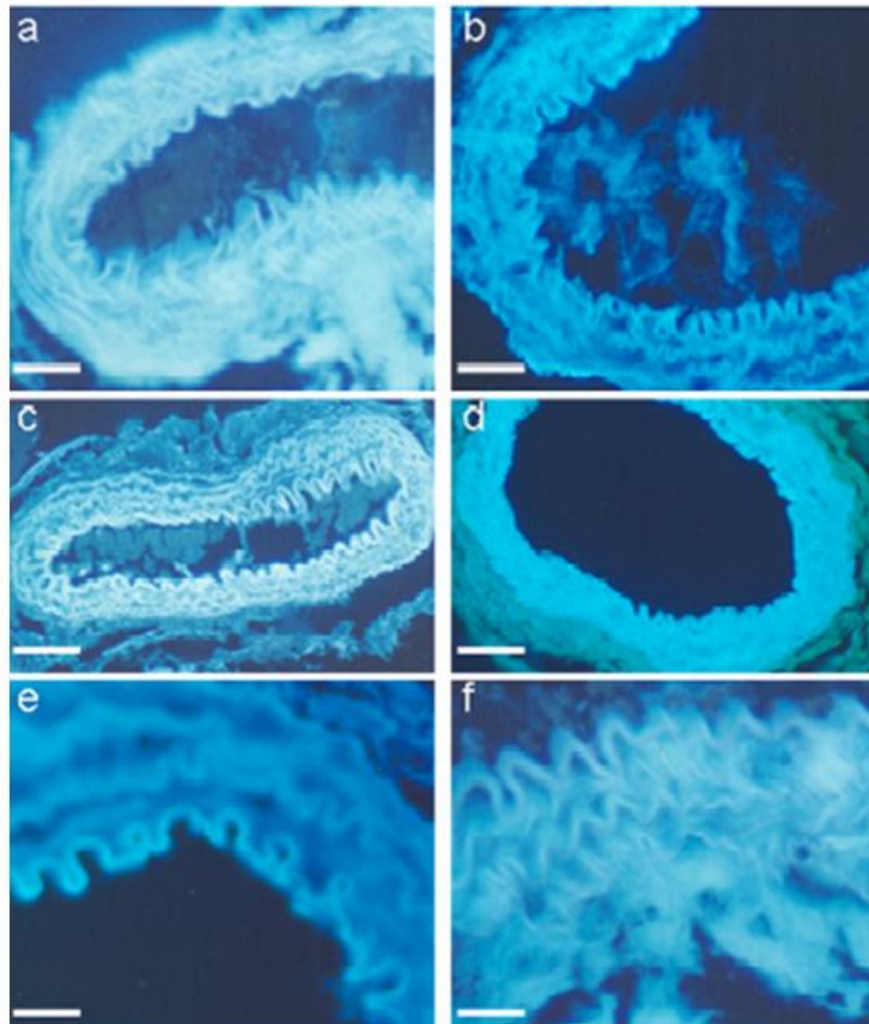
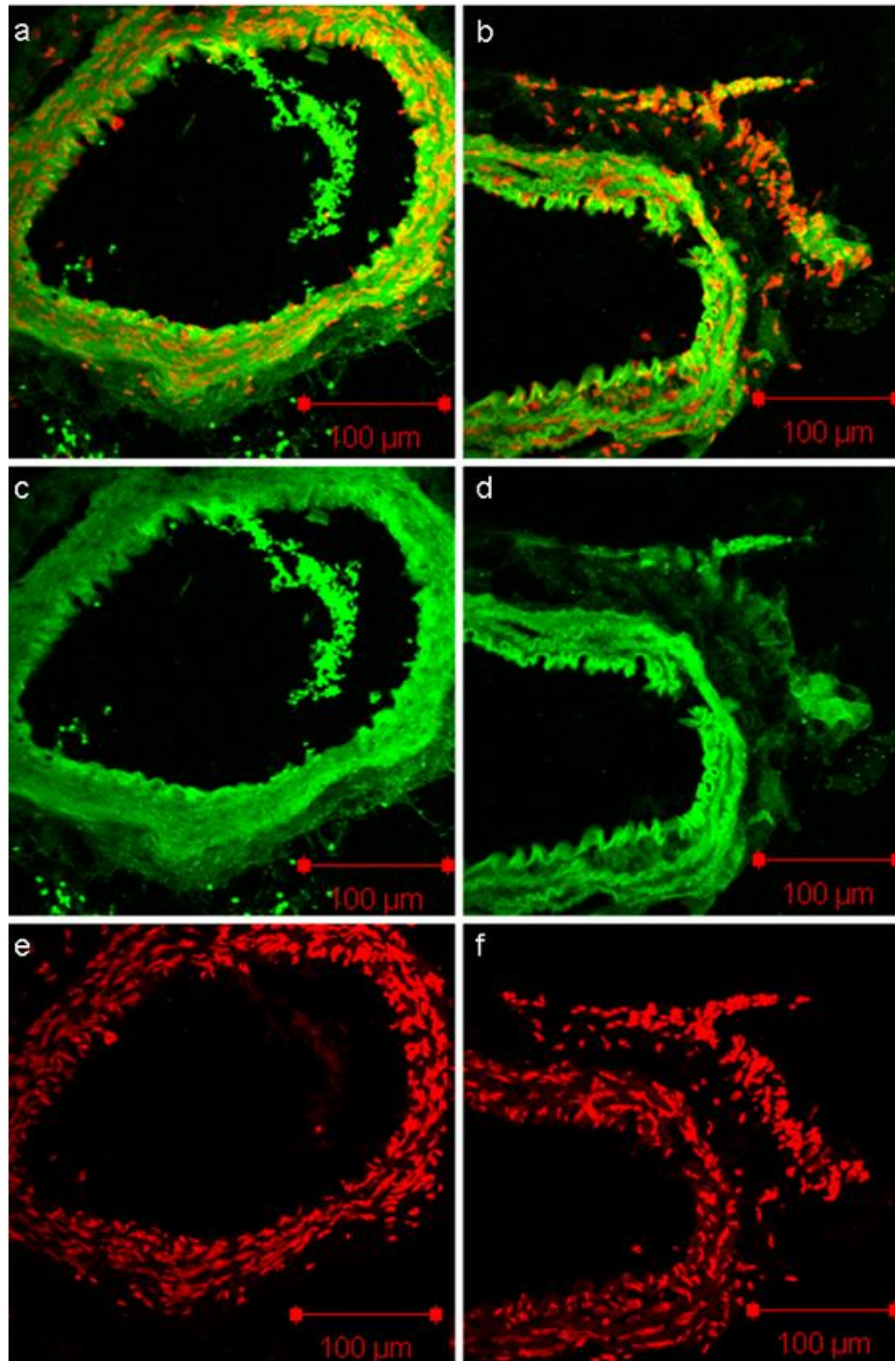


Figure 2



## **CONCLUSÕES**

---

- Análise dos valores de retardo óptico associados com a birrefringência intrínseca e a birrefringência de forma, bem como análise do dicróismo linear em amostras coradas com ponceau SS revelaram-se metodologias adequadas para informar sobre alterações concernentes a ordem e empacotamento molecular de fibras colágenas do estroma corneal de camundongos;
- Imagens birrefringentes contêm informação tridimensional. O plano X-Y dos polarizadores contém informação bidimensional relacionada à topografia e orientação espacial das fibras colágenas. O plano Z contém a informação tridimensional devido ao retardo óptico;
- O brilho da birrefringência de fibras colágenas da córnea (valores de retardo óptico) varia de acordo com a metodologia utilizada para preparação das amostras, uma vez que o retardo óptico é uma função do ângulo das fibras colágenas relativo aos planos de luz polarizada cruzados;
- Diabetes foi capaz de alterar a cristalinidade e o empacotamento molecular de fibras colágenas do estroma corneal de camundongos diabéticos não-obesos (NOD);
- O estroma corneal de camundongos NOD/Uni e BALB/c/Uni contém macromoléculas removíveis pela hialuronidase testicular, contribuindo para as propriedades ópticas do tecido;

- Diabetes não foi capaz de afetar a organização espacial dos glicosaminoglicanos. Tanto nos camundongos NOD/Uni quanto nos camundongos não-diabéticos, as cadeias de glicosaminoglicanos estavam estatisticamente orientadas paralelamente ao longo eixo das fibras colágenas, contribuindo para suas propriedades anisotrópicas;
- Alterações moleculares em fibras colágenas do estroma corneal são potencialmente capazes de comprometer a biomecânica e a transparência da córnea, prejudicando sua função refrativa e, conseqüentemente, a acuidade visual;
- Cloreto de danzila e anilino-sulfato de naftaleno foram capazes de detectar alterações estruturais em elastina e colágeno supramolecular da aorta abdominal de camundongos NOD. Devido à especificidade desses corantes, em especial do cloreto de danzila, eles poderiam ser industrialmente explorados para o desenvolvimento de biossensores para detecção de hemoglobinas ou outras proteínas glicosiladas por diabetes;
- Reação de Feulgen mostrou-se um método apropriado para análises nucleares usando microscopia de varredura laser confocal, uma vez que oferece fluorescência adequada e duradoura;
- Diabetes foi capaz de alterar propriedades ópticas (birrefringência e fluorescência) em colágeno e elastina da matriz extracelular da aorta de camundongos NOD/Uni. Possivelmente, essas mudanças devem se refletir na funcionalidade do caminho aórtico, alterando-o.

**ANEXO**

---

## DECLARAÇÃO

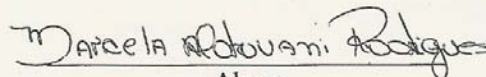
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/ tese de mestrado/doutorado intitulada "Organização supramolecular, orientação espacial e propriedades ópticas de proteínas extracelulares em córneas e aortas de camundongos espontaneamente diabéticos":

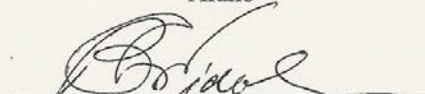
( ) não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

( ) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_

( X ) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 957-1).

( ) tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº \_\_\_\_\_).

  
Aluno

  
Orientador

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

\_\_\_\_\_  
Nome:  
Função: