

EDUARDO MELANI ROCHA

***SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM GLÂNDULAS
LACRIMAIS E SALIVARES, E EM SUPERFÍCIE
OCULAR***

*Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutor em Clínica
Médica, na área de Clínica Médica.*

Orientador: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE**

Campinas

2000

iii



UNIDADE B.C.
 N.º CHAMADA: TIUNICAMP
R582s
 V. 16 3695
 TOMBO BC/ 16-392/01
 PROC. 16-392/01
 C 1 D 1
 PREC. R\$ 11,00
 DATA 09/03/01
 N.º CPD

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
 UNICAMP**

CM-00147243-5

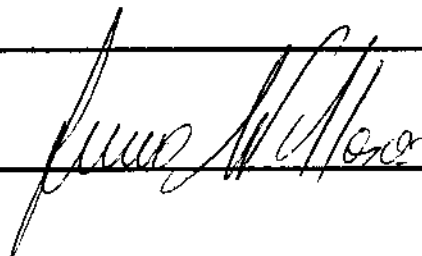
R582s Rocha, Eduardo Melani
 Sinalização da insulina em glândulas lacrimais, salivares e superfície ocular / Eduardo Melani Rocha. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientador : Lício Augusto Velloso
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

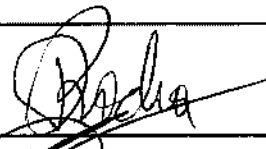
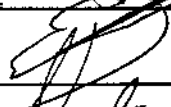
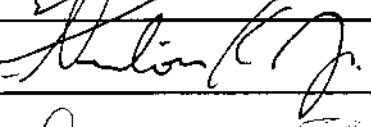
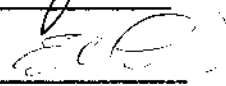
1. Insulina Receptores. 2. Envelhecimento – aspectos moleculares.
 3. Diabetes Mellitus. 4. Gênero. I. Lício Augusto Velloso. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
 IV. Título.

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso



Membros:

1. Prof. Dr. Flávio Jaime de Rocha 
2. Prof. Dr. Edcio Hiro Sato 
3. Prof. Dr. Newton Kana Jose 
4. Prof. Dr. Eduardo Magalhães Carneiro 
5. _____

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

Data: 08/11/00

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

DEDICATÓRIA

À minha família

AGRADECIMENTOS

Pela paciente orientação durante a elaboração do projeto, acompanhamento e sugestões durante a obtenção dos dados e revisão cuidadosa do manuscrito, agradeço ao meu orientador, Lício A. Velloso.

Agradeço a competente colaboração científica nas sugestões e comentários críticos de Antonio C. Boschero, A. Emiko Hirata, Carla R. O. Carvalho, David A. Sullivan, Everardo M. Carneiro, Kleber G. Franchini, Lília A. S. Rocha e Mário J. A. Saad.

A execução dos experimentos teve a inestimável colaboração de Daniel A. Cunha, Inara Ignacchitti, Luiz Janeri, Maria Helena M. Lima e Renata D. Pithon.

A correção e a edição do texto foram eficientemente executadas pela Sra. Lilian do Rocio Borba.

O estímulo para me dedicar a investigação científica devo a meus pais e aos professores Newton Kara José, Carlos E. Leite Arieta e Gilberto de Nucci.

Aos alunos e residentes da Unicamp devo agradecer pela curiosidade e pelo inconformismo de querer saber o que não está escrito e o que nunca foi demonstrado.

Aos pacientes eu agradeço pela inspiração e pelas informações trazidas na esperança de dias melhores.

Finalmente, aos meus amigos e colegas de trabalho eu agradeço pelo estímulo e pela ajuda, direta ou não, para que este trabalho chegasse ao final.

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. OBJETIVOS.....	35
3. METODOLOGIA.....	39
3.1. Quantificação de insulina e proteínas totais na lágrima humana.....	41
3.2. Animais experimentais.....	42
3.3. Determinação da glicemia, da insulina sérica, do teste de tolerância à insulina e do ciclo estral e realização dos teste de tolerância à insulina.....	43
3.4. Tecidos humanos.....	44
3.5. Imunohistoquímica.....	45
3.6. Imunoprecipitação.....	46
3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	46
3.8. Transferência e “Immunoblotting”.....	47
3.9. Análise estatística.....	49
4. RESULTADOS.....	51
4.1. Quantificação de insulina e proteínas totais na lágrima humana.....	53
4.2. Identificação do receptor de insulina e do receptor de IGF-I em glândulas lacrimais e salivares de rato.....	54
4.3. Identificação do RI e IGF-IR em córnea e conjuntiva humana.....	54
4.4. Curva tempo-resposta à insulina em glândulas lacrimal e salivar.....	55

4.5. Curva dose-resposta à insulina em glândulas lacrimal e salivar.....	56
4.6. Influência do <i>Diabetes Mellitus</i> nas vias de sinalização de insulina em glândulas lacrimais e salivares.....	56
4.7. Influência do envelhecimento nas vias de sinalização de insulina em glândulas lacrimais e salivares.....	57
4.8. Influência do gênero nas vias de sinalização de insulina em glândulas lacrimais e salivares.....	58
5. DISCUSSÃO.....	61
5.1. Quantificação de insulina e proteínas totais na lágrima humana.....	63
5.2. Identificação dos elementos participantes da via de sinalização de insulina em glândulas lacrimais, salivares, córnea e conjuntiva.....	66
5.3. Influência do <i>Diabetes Mellitus</i> nas vias de sinalização de insulina em glândulas lacrimais e salivares.....	69
5.4. Influência do envelhecimento nas vias de sinalização de insulina em glândulas lacrimais e salivares.....	70
5.5. Influência do gênero nas vias de sinalização de insulina em glândulas lacrimais e salivares.....	73
6. CONCLUSÕES.....	77
7. SUMMARY.....	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
9. ANEXOS.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP _c :	Adenosina monofosfato cíclico ou adenilato cíclico
APS:	Amonia persulfato
ATP:	Adenosina trifosfato
°C:	Graus Celsius
CA:	Califórnia
Ci:	Curie (unidade de radioatividade, $3,70 \times 10^{10}$ desintegrações s ⁻¹)
Da:	Dalton (peso de um átomo de hidrogênio, $1,66 \times 10^{-24}$ g)
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DMDI:	<i>Diabetes mellitus</i> dependente de insulina
EDTA:	Ácido etilenodiamino-tetra-acético
EGF:	"Epidermal growth factor"
EPM:	Erro-padrão médio
EUA:	Estados Unidos da América
g:	Gramma, precedida pelas notações de ordem de grandeza do sistema internacional de unidades; p- pico(10^{-12}), n- nano (10^{-9}), μ - micro (10^{-6}), m- mili (10^{-3}), k- quilo (10^3)
GH:	Hormônio de crescimento
GL:	Glândula lacrimal
GRB2:	"Growth factor receptor binding protein 2"
GS:	Glândula salivar
GTT:	Teste de tolerância a glicose
IGF:	"Insulin-like growth factor"
IGF-IR:	Receptor do "insulin-like growth factor-I"

IGFBP:	“Insulin-like growth factor binding protein”
IgG:	Imunoglobulina G
IRS-1:	“Insulin receptor substrate-1”
IRS-2:	“Insulin receptor substrate-2”
ITT:	Teste de tolerância a insulina
JAK-2:	<i>Janus</i> quinase-2 (“janus kinase-2”)
kITT :	Tangente do ângulo de decaimento da curva glicêmica em resposta à insulina
l:	Litros (precedida pelas notações de ordem de grandeza do sistema internacional de unidades; μ - micro, m- mili)
M:	Molar, precedida pelas notações de ordem de grandeza do sistema internacional de unidades; p- pico, n- nano, μ - micro)
MAPK:	“Mitogen-activated protein kinase”
μ l:	Microlitros
MO:	“Missouri”
n:	Número de amostras ou animais usados no experimento
N:	Concentração normal
NGF:	“Nerve growth factor”
nm:	Nanômetros
NOD:	“Non-obese diabetic mouse”
p:	Probabilidade associada com a ocorrência sob a hipótese nula (H_0) de um valor tão extremo quanto o valor mais extremo observado
PDGF:	“Platelet-derived growth factor”
pH:	- log da concentração H^+
PI3-K:	Fosfatidil insitol-3-quinase
PIAS:	“Protein inhibitor of activated” <i>STAT</i>

PSMF:	Fenil-metil-sulfonil fluoreto
r:	Coeficiente de correlação
RI:	Receptor de insulina
RNA:	Ácido ribonucleico
rpm:	Rotações por minuto
SDS:	Sódio dodecil sulfato
SH2:	“Src homology 2”, região presente em diversos transdutores intra-celulares de sinalização
Shc:	Transdutor de sinalização intracelular, que recebeu este nome devido a semelhança estrutural do seu sítio de acoplamento com uma sequência de aminoácidos com função semelhante, presente no colágeno (“Src homology 2/ α -collagen related”)
SNC:	Sistema nervoso central
SOS:	“Son-of-Sevenless”
SS-1:	“STAT-induced STAT inhibitor”
STAT-1:	“Signal transducer and activator of transcription-1”
Temed:	Tetrametil-etilenodiamina
$t^{1/2}$:	Tempo médio
Y ^P	Aminoácido tirosina fosforilado

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1: Características da população investigada para análise de insulina no filme lacrimal.....	109
Tabela 2: Características dos tecidos humanos usados para identificação do receptor de insulina e do receptor de IGF-I.....	109
Tabela 3: Peso, glicemia, insulina sérica e K_{ITT} dos grupos de ratos usados nos experimentos considerando-se <i>diabetes</i> , envelhecimento e gênero.....	110
Tabela 4: Densitometria da expressão de proteína nas glândulas lacrimais e salivares nos grupos de ratos diabéticos, senis e fêmeas comparada a do grupo-controle, analisada em paralelo.....	110
Tabela 5: K_{ITT} de ratos machos e fêmeas nas quatro fases do ciclo estral.....	111

	PÁG.
Figura 1: Transmissão do sinal da insulina. Representação esquemática de uma célula em que a ligação da insulina ao seu receptor (RI), uma proteína transmembrana com estrutura heterotetramérica, induz a ativação deste e a subsequente ativação de vias de sinalização citoplasmáticas dirigidas a atividade metabólica (representada pelo GLUT-4 promovendo a captação de glicose) e a transmissão do sinal insulínico ao núcleo celular onde promove eventos como transcrição gênica e controle da proliferação celular.....	113
Figura 2: Imunohistoquímica da glândula lacrimal, indicando a presença do receptor de insulina (a) e do receptor de “insulin-like growth factor-I” (b) em citoplasma e membrana plasmática de células epiteliais. Controle negativo (c). (Aumento de 400 vezes).....	114
Figura 3: Imunohistoquímica da glândula salivar, indicando a presença do receptor de insulina (a) e do receptor de “insulin-like growth factor-I” (b) em citoplasma e membrana plasmática de células epiteliais. Controle negativo (c). (Aumento de 400 vezes).....	115
Figura 4: Imunohistoquímica da córnea humana indicando a presença do receptor de insulina (A) e do receptor de “insulin-like growth factor-I” (B) em citoplasma e membrana plasmática de células epiteliais. Controles negativos (C, D). (Aumento de 400 vezes).....	116
Figura 5: Imunohistoquímica da conjuntiva humana indicando a presença do receptor de insulina (A) e do receptor de “insulin-like growth factor-I” (B) em citoplasma e membrana plasmática de células epiteliais e os controles negativos (C, D). (Aumento de 400 vezes).....	116

Figura 6:	Curva tempo-resposta da fosforilação em tirosina do RI, IGF-IR, IRS-1, IRS-2, Shc, JAK-2 e STAT-1. Glândulas salivares (GS) e lacrimais (GL) de ratos analisadas por imunoprecipitação seguida de “immunoblotting” após a injeção de salina (0) ou insulina (100 μ M).....	117
Figura 7:	Curva dose-resposta da fosforilação em tirosina do RI, IGF-IR, IRS-1, IRS-2, Shc, JAK-2 e STAT-1. Glândulas salivares (GS) e lacrimais (GL) de ratos analisadas por imunoprecipitação seguida de “immunoblotting” após a injeção de salina (0) ou insulina nas doses de 10^{-11} M a 10^{-5} M.....	118
Figura 8:	Efeito do <i>diabetes mellitus</i> sobre a fosforilação em tirosina do RI em GL e GS (a, b), do Shc em GL e GS (c, d), e do STAT-1 em GL e GS (e, f).....	119
Figura 9:	Efeito do envelhecimento sobre a fosforilação em tirosina do RI em GL e GS (a, b), do Shc em GL e GS (c, d), e do STAT-1 em GL e GS (e, f).....	120
Figura 10:	Efeito do gênero sobre a fosforilação em tirosina do RI em GL e GS (a, b), do Shc em GL e GS (c, d), e do STAT-1 em GL e GS (e, f).....	121
Figura 11:	Efeito do ciclo estral sobre a fosforilação em tirosina do RI em GL (A) e GS (B).....	122

LISTA DE GRÁFICOS

	PÁG.
Gráfico 1: Comparação entre os níveis de insulina no filme lacrimal de voluntários masculinos e femininos, alimentados e em jejum.....	112
Gráfico 2: Comparação entre os níveis de insulina no filme lacrimal de voluntários alimentados e em jejum.....	112
Gráfico 3: Relação entre os níveis de insulina e proteína na lágrima humana..	112

[The page contains faint bleed-through from the reverse side, showing handwritten notes and possibly another drawing.]

As células da superfície ocular assim como os tecidos das glândulas salivares e lacrimais respondem à insulina quando em cultura, e podem sofrer modulação no seu ritmo de proliferação quando expostas a este hormônio. Os objetivos do presente estudo foram: (1) investigar a presença da insulina no filme lacrimal; (2) identificar o receptor de insulina, bem como os elementos participantes da via de sinalização intracelular da insulina nestes tecidos; (3) conhecer os efeitos de *diabetes mellitus*, envelhecimento e gênero sobre as etapas iniciais da sinalização da insulina em glândulas lacrimais e salivares de ratos. A presença de insulina na lágrima foi avaliada por radioimunoensaio enquanto que a identificação dos elementos envolvidos na transmissão do sinal insulínico e a resposta celular ao hormônio foram avaliados através de imunohistoquímica, imunoprecipitação e “immunoblotting”. A insulina foi identificada em lágrima humana, havendo aparente relação com níveis circulatórios do hormônio. Demonstrou-se que: o receptor de insulina e o IGF-IR estão presentes na córnea e na conjuntiva humana, e também que o RI, IRS-1, IRS-2, Shc, IGF-IR e STAT-1 estão presentes em glândulas lacrimais e salivares de ratos; a fosforilação insulino-induzida do receptor de insulina foi significativamente menor em glândula lacrimal de ratos diabéticos, senis e do gênero feminino se comparados a seus respectivos grupos-controle; a fosforilação do receptor de insulina foi significativamente menor em glândulas salivares de ratos velhos e do gênero feminino do que em seus respectivos grupos-controle. O presente estudo traz evidências da ação da insulina sobre glândulas lacrimais e salivares, e na superfície ocular, bem como indícios de que o *diabetes mellitus*, o envelhecimento e o gênero influenciam a transmissão do sinal da insulina em glândulas lacrimais e salivares.

1. INTRODUÇÃO

Glândulas salivares e lacrimais são tecidos com função secretória exócrina, cujos produtos, saliva e lágrima respectivamente, são responsáveis pela proteção e preservação das estruturas da cavidade oral e da superfície ocular. As atividades dessas glândulas são reguladas por estímulos neurais, imunes e hormonais.

As glândulas lacrimais são responsáveis pela secreção da fração aquosa do filme lacrimal carreando além de água, nutrientes e eletrólitos utilizados para umidificar e manter o metabolismo da superfície ocular, o que é fundamental para que se obtenha ótima qualidade óptica da imagem (ROCHA, ROCHA, PENA, 2000; RIEGER, 1992). A lágrima também contém agentes envolvidos em vigilância imunológica tais como imunoglobulinas, lisozimas e lactoferrinas, e fatores de crescimento responsáveis por proporcionar estímulo de diferenciação e crescimento celular necessários no reparo de lesões ou na própria renovação do epitélio ocular (ROCHA *et al.*, 2000b; PLUGFELDER, 1998; WILSON, 1991). Da mesma forma, as glândulas salivares, que possuem origem embrionária similar às lacrimais (GARCIA, JECKEL NETO, GARCÍA-FERNANDEZ, 1991), secretam a saliva na cavidade oral, secreção esta que desempenha papel de lubrificação, defesa imunológica e de adjuvante nos passos iniciais da digestão dos alimentos (VISSINK, SPIRJKERVET, AMERONGEN, 1996).

As glândulas salivares e lacrimais podem ser acometidas por doenças degenerativas que levam a uma progressiva perda funcional com conseqüente manifestação de olho seco e boca seca. Tais degenerações podem ser decorrentes de uma adenite autoimune como a presente na Síndrome de Sjögren (SULLIVAN *et al.*, 1997; TODA *et al.*, 1999), por alterações de caráter indeterminado presentes em doenças crônicas como *diabetes mellitus* (RAMOS-REMUS, SUAREZ-ALMAZOR, RUSSEL, 1994; SEIFART & STREMPER, 1994; GOEBBELS, 2000; SREEBNY *et al.*, 1989; MURRAH, 1985), ou ainda no processo fisiológico de envelhecimento (ASTOR, HANFT, CIOCON, 1999; THOMSON *et al.*, 1999, VISSINK, SPIRJKERVET, AMERONGEN, 1996; MCGILL *et al.*, 1984; BROMBERG & WELCH, 1985; MATHERS, LANE, ZIMMERMAN, 1996). Sabe-se ainda que existem diferenças determinadas pelo gênero quanto à morfologia e funcionalidade das glândulas salivares e lacrimais (JACOBY & LEESON, 1959; SULLIVAN *et al.*, 1998). Além disso, pesquisas recentes indicam que estas diferenças vão

além dos aspectos morfofuncionais e podem estar relacionadas à fisiopatologia das alterações presentes na síndrome de Sjögren (SATO & SULLIVAN, 1993; ROCHA *et al.*, 1993; SULLIVAN *et al.*, 1998; TODA *et al.*, 1999; ROCHA *et al.*, 2000c).

A superfície ocular por sua vez contém elementos para a proteção ocular, distribuição de lágrima, secreção de componentes do filme lacrimal como lípidos e mucinas (TSENG & TSUBOTA, 1997) e a mais poderosa estrutura refrativa do olho humano: a córnea, um tecido avascular, transparente, portanto uma lente com cerca de 48 dioptrias, que também atua como proteção contra agentes externos (PEPOSE & UBELS, 1992).

O olho seco e a boca seca, que apresentam como sinônimos xerofthalmia ou ceratoconjuntive *sicca* e xerostomia, respectivamente, estão relacionados à deficiência qualitativa ou quantitativa da secreção de lágrima e saliva. Mais especificamente, o olho seco pode ser definido como “uma alteração do filme lacrimal por deficiência de lágrima ou evaporação excessiva que causa dano à superfície ocular inter-palpebral e se associa a sintomas de desconforto ocular” (LEMP, 1995), estando associado a várias doenças bem distintas, porém os sinais clínicos não se correlacionam bem com os sintomas e os testes aplicados na prática clínica ainda apresentam limitações, principalmente em casos leves e moderados (LEMP, 1995). Estima-se que nos EUA, entre 7 e 10 milhões de pessoas sofram de olho seco e que cerca de metade desses indivíduos teriam mais de 65 anos (SCHEIN *et al.*, 1997; SULLIVAN & SATO, 1992). Entre as doenças auto-imunes, a síndrome de Sjögren - uma das entidades que associa olho seco e boca seca - é a segunda mais comum, afetando cerca de 1% da população geral, com um predomínio em mulheres de 9:1 (SULLIVAN & SATO, 1992). Entre os indivíduos que procuram cuidados oculares no Canadá, mais de 20% queixam-se de olho seco e estima-se que este quadro seja grave em 45 de cada 10 mil habitantes (CAFFERY *et al.*, 1998). De forma similar, estima-se que mais de 20% dos adultos que procuram tratamento oral, queixam-se de boca seca, e que este sintoma estaria relacionado ao gênero feminino, *diabetes mellitus*, envelhecimento, doenças auto-imunes e uso de medicações (SREEBNY *et al.*, 1988, SREEBNY *et al.*, 1989; ASTOR, HANFT, CIOCON, 1999; THOMSON *et al.*, 1999).

A deficiência ou a ausência do filme lacrimal pode afetar seriamente a função ocular, produzindo ressecamento epitelial, ulceração e perfuração corneana, predisposição a infecções e até a cegueira (SULLIVAN *et al.*, 1999). Uma vez que não se conhece até o momento tratamentos curativos para o olho seco ou boca seca, as estratégias se limitam à umidificação com lágrima e saliva artificial, e para os olhos o uso de recursos para aumentar a retenção do filme lacrimal como oclusores do ponto de drenagem da lágrima ou óculos fechados para reduzir a evaporação. Em casos de olho seco grave, o uso de soro autólogo vem sendo recomendado tanto para síndrome de Sjögren como para a doença do enxerto *versus* hospedeiro (TSUBOTA *et al.*, 1998; ROCHA *et al.* 2000a).

O papel de hormônios na fisiopatologia das disfunções lacrimais, salivares e da superfície ocular vem sendo investigado (SATO & SULLIVAN, 1993; ROCHA *et al.*, 1993; SULLIVAN *et al.*, 1998; TODA *et al.*, 1999; ROCHA *et al.*, 2000c), inclusive com perspectivas de tratamento utilizando preparações hormonais como andrógenos e estrógenos para promover a regularização da secreção lacrimal destas disfunções (SULLIVAN *et al.*, 1999; AKRAMIAN *et al.*, 1998; ESMAELI, HARVEY, HEWLETT, 2000) e insulina ou do “insulin-like growth factor I” para acelerar a cicatrização corneana (SARAGAS *et al.*, 1985; WOOST *et al.*, 1985, NISHIDA *et al.*, 1996).

A insulina é um hormônio produzido e secretado pelas células beta das ilhotas pancreáticas, que exerce importantes funções na homeostase da glicose, na regulação da oferta e armazenamento de substratos energéticos e no crescimento e diferenciação celular em diversos tecidos (MYERS & WHITE, 1996). Tal variedade de ações é exercida através da ativação do receptor de insulina (IR), uma proteína transmembrana, com estrutura heterotetramérica (duas sub-unidades alfa e duas sub-unidades beta), que pertence à família dos receptores com atividade tirosina quinase (ULLRICH *et al.*, 1985). Subseqüentemente à ligação da insulina à sub-unidade alfa extra-celular, induz-se uma alteração conformacional da sub-unidade beta, ativando desta forma seu sítio catalítico com propriedade tirosina quinase. Vários resíduos tirosina da própria sub-unidade beta são então fosforilados, recrutando a seguir diversos substratos intracelulares que serão também fosforilados em tirosina. Estes substratos por sua vez serão responsáveis por deflagrar uma seqüência de eventos em cadeia que direcionarão o sinal da insulina para diferentes

compartimentos celulares onde, finalmente, se observará alguma forma de modulação funcional gerada pela insulina (MYERS & WHITE, 1996; BORG & MARGOLIS, 1998) (Figura 1). Este complexo sistema de transmissão do sinal prevê, além de mecanismos de amplificação e inibição, também a diversificação em vias específicas para modulação de fenômenos determinados, e a interação com vias de sinalização de outros transmissores sejam eles citocinas, fatores de crescimento ou hormônios (WHITE & YENUSH, 1998; SAAD, VELLOSO, CARVALHO, 1995; VELLOSO *et al.*, 1996; THIRONE *et al.*, 1997).

Entre os substratos da insulina que no citoplasma de células alvo são responsáveis por amplificar, diversificar ou modular o estímulo estão os IRSs (“Insulin Receptor Substrates”), mediadores do crescimento e metabolismo, que podem agir através da ativação da fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3-K), ou da via da Ras/Raf/Mitogenic-activated protein Kinase (MAPK) (MYERS & WHITE, 1996; ARAKI *et al.*, 1994; SUN *et al.*, 1995). Esta última via pode também ser ativada por uma classe de proteínas acopladoras chamadas Shc, capazes de interagir através de resíduos fosforilados de tirosina com o acoplador Grb2 e desta forma direcionar o sinal da insulina para o controle de crescimento celular e mitogenese (WHITE & YENUSH, 1998; PELICCI *et al.*, 1992).

Outro grupo de proteínas citoplasmáticas sinalizadoras que respondem a diversos estímulos extra-celulares, incluindo à insulina são as “signal transducers and activators of transcription” (STATs), responsáveis pela mediação de uma série de fenômenos biológicos, dentre os quais os de resposta às citocinas são os mais bem estudados. Uma vez ativadas as STATs migram do citoplasma ao núcleo onde estimulam a transcrição de genes cujos produtos serão efetores do sinal. A ativação das STATs requer a mediação de transdutores com atividade tirosina quinase. Classicamente as proteínas da família Jak (“Janus kinase”) são as intermediárias entre o receptor transmembrana e as STATs, entretanto estudos recentes tem demonstrado que estas podem ser ativadas diretamente por receptores que possuem atividade tirosina quinase intrínseca (DARNELL JR., KERR, STARK, 1994; DARNELL JR., 1997, CHEN *et al.*, 1997; CHUANG *et al.*, 1997).

Os “insulin-like growth factors” (IGFs) -I e -II são peptídeos com atividade autócrina e parácrina envolvidos em desenvolvimento, diferenciação e crescimento celular. O IGF-I e seu receptor apresentam grande similaridade com a insulina e o RI respectivamente, daí o seu nome. Além da semelhança, insulina e IGF-I utilizam elementos comuns para a transdução do seu sinal. Existem evidências de que insulina ou IGF-I possam influenciar um ao sinal intracelular do outro, através de um fenômeno conhecido como comunicação cruzada intracelular (“intra-cellular cross-talk”) (JONES & CLEMMONS, 1995).

A sinalização da insulina tem sido estudada principalmente em tecidos como fígado, músculo e tecido adiposo, os quais estão envolvidos na captação e armazenamento da glicose e portanto participam ativamente da regulação dos níveis sanguíneos deste açúcar (SAAD, 1994; GRODSKY, 1996). As ações da insulina em glândulas lacrimais e salivares e na superfície ocular e cavidade oral podem ser evidenciadas através da elevada prevalência de boca seca (MURRAH, 1985; SREEBNY *et al.*, 1989), problemas dentários (EMRICH, SHLOSSMAN, GENCO, 1991), olho seco (RAMOS-REMUS, SUAREZ-ALMAZOR, RUSSEL, 1994; SEIFART & STREMPER, 1994; GOEBBELS, 2000) e também problemas corneanos como defeitos epiteliais (HYNDIUK *et al.*, 1977; TSUBOTA, YAMADA, NAOI, 1991; ISHIDA *et al.*, 1984), alterações na membrana basal do epitélio (AZAR *et al.*, 1992) e dificuldade no controle hídrico (MCNAMARA *et al.*, 1998) em pacientes diabéticos e resistentes à insulina. Além disto, diversos estudos têm indicado a necessidade de insulina na composição de meios para que se mantenham culturas celulares primárias de córnea e glândula lacrimal (SCHULTZ *et al.*, 1992; LINDBERG *et al.*, 1993; PELLEGRINI *et al.*, 1997; HANN, KELLEHER, SULLIVAN, 1991). Estudos com modelos animais diabéticos demonstram redução quantitativa e qualitativa da secreção lacrimal e salivar e dificuldade de re-epitelização (SULLIVAN & HANN, 1989; HU *et al.*, 1992; FUKUSHI *et al.*, 1980), porém os mecanismos moleculares destas alterações não são conhecidos.

A sinalização da insulina em tecidos alvo pode ser afetada por: (1) condições que levem a uma redução da produção do hormônio pelas células beta-pancreáticas ou (2) por situações que causem resistência periférica à insulina, sendo resistência periférica

definida como uma resposta biológica subnormal a uma determinada dose de insulina (MOLLER & FLIER, 1991). A primeira situação é aquela decorrente da lesão específica da célula beta pancreática como a que ocorre em *diabetes mellitus* tipo 1 (DM 1), ou por extensas lesões pancreáticas, ou ainda devido a retirada cirúrgica do pâncreas. O segundo mecanismo apresenta um espectro clínico mais amplo que envolve além do DM 1, outras formas de DM, e também quadros intermediários, fisiológicos ou não, como gestação, obesidade e envelhecimento (MOLLER & FLIER, 1991; SAAD, 1994).

A investigação da presença de insulina em lágrima e a avaliação da via de sinalização da insulina em glândulas lacrimais, salivares e superfície ocular poderá portanto permitir que se conheçam os mecanismos de ação da insulina nestes tecidos e potencialmente contribuir para a compreensão de doenças que cursem com boca seca e olho seco.

2. OBJETIVOS

1. Avaliar a presença de insulina na lágrima e avaliar a relação entre gênero e estado alimentar (jejum ou pós-prandial) sobre a concentração desse hormônio na lágrima humana.

2. Avaliar a presença e distribuição do receptor de insulina em glândulas lacrimais, glândulas salivares e superfície ocular.

3. Caracterizar a presença e função de elementos participantes da via de sinalização celular da insulina em glândulas lacrimais e glândulas salivares.

4. Investigar a influência de *diabetes*, envelhecimento e gênero sobre elementos da via de sinalização da insulina em glândulas lacrimais e glândulas salivares.

1. 研究の目的と意義
 2. 研究の背景
 3. 研究の目的
 4. 研究の意義
 5. 研究の範囲
 6. 研究の方法
 7. 研究の結果
 8. 研究の結論
 9. 研究の限界
 10. 研究の展望

3. **METODOLOGIA**

3.1. QUANTIFICAÇÃO DE INSULINA E PROTEÍNAS TOTAIS NA LÁGRIMA HUMANA

Amostras de lágrima foram colhidas de 33 voluntários sadios (médicos residentes e funcionários da universidade) (Tabela 1), após estímulo com jato de ar comprimido sobre a córnea, para identificação e quantificação de insulina por radioimunoensaio, segundo método previamente descrito (SCOTT, ATWATER, ROJAS, 1981). Esse experimento se seguiu à obtenção de consentimento pós-informação dos participantes e também observou as orientações da Declaração de Helsinki.

A fim de observar a influência da alimentação na quantidade de insulina da lágrima, 5 indivíduos do gênero masculino e 5 do gênero feminino foram solicitados a comparecer em jejum de 12 horas, enquanto os outros 23 (12 homens e 11 mulheres) compareceram cerca de 30 minutos após o café da manhã, com ingesta estimada média de 400 kCal. O volume de lágrima colhido com micropipetas de precisão e ponteiros descartáveis variou de 15 a 70 μ l e foi rapidamente transferido para tubos contendo 30 μ l de solução de cloreto de sódio a 0,9 %, mantidos em gelo e congelados a -80 °C até o dia do processamento.

As amostras foram novamente diluídas em solução tampão de fosfato (pH 7,4), contendo também 9 g/l de cloreto de sódio e 5 g/l de albumina bovina, a fim de alcançar um volume de 100 μ l/amostra. Após isso, foi adicionado anticorpo policlonal anti-insulina e insulina marcada com I^{125} na posição tirosina A14 (Amersham, Aylesbury, Reino Unido), a fim de obter uma contagem radioativa de 1100 cpm/tubo. As amostras foram então mantidas em incubação por 72 h e após a remoção do material suspenso a contagem radioativa foi feita no cintilador Beckman gamma 500, seguida do cálculo da concentração de insulina, recuperando os valores de volume de lágrima inicialmente obtidos.

Os seguintes controles foram utilizados: a) curvas de titulação com dosagens conhecidas de insulina comercial, a fim de verificar a faixa de sensibilidade da análise e reprodutibilidade dos valores esperados, b) amostras contendo além do tampão, apenas insulina- I^{125} e anticorpo anti-insulina, ou apenas anticorpo anti-insulina ou ainda apenas insulina- I^{125} e, por último, c) amostras contendo IGF-I recombinante humano em várias diluições a fim de avaliar a especificidade do método (Sigma, St Louis, MO).

Os coeficientes de variação intra-ensaio e interensaio obtidos foram 7,5 e 12 %, respectivamente.

A quantificação de proteínas na lágrima humana foi feita usando 20 µl de lágrima em 1 ml de corante de biureto (Labtest, Lagoa Santa, MG) através da leitura espectrofotométrica da absorbância, após 15 minutos a 22° C no comprimento de onda de 545 nm (espectrofotômetro Femto 432, São Paulo, SP), usando albumina do soro humano com concentração conhecida como padrão para o cálculo da concentração das amostras.

3.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram usados ratos Wistar, machos e fêmeas, adultos jovens (8 semanas) ou senis (20 meses), obtidos do Biotério Central da Unicamp em conformidade com normas de condutas para experimentação com animais. Glândulas lacrimais exoftálmicas e glândulas salivares submandibulares foram extraídas sob anestesia geral com tiopental sódico na dose de 100 µg/kg (Cristália, Itapira, SP), de acordo com orientações de estudos pilotos e descrições prévias (NAVIA & NARKATES, 1980; TODA *et al.*, 1999).

Nos experimentos para determinação das curvas-tempo e dose-resposta ótimas para a fosforilação de receptores e proteínas intermediárias da via de sinalização intracelular da insulina, as glândulas foram extraídas de diferentes animais, variando progressivamente o tempo de 0 a 15 minutos, após a injeção através da veia cava inferior, de 200 µl de uma solução contendo insulina a 10 µM (curva tempo-resposta) ou variando as doses progressivamente de 0 (soro fisiológico a 0,9%), 10 pM, 1 nM, 100 nM e 10 µM (curva dose-resposta). Em seguida à coleta, os tecidos foram submetidos ao protocolo de imunoprecipitação com os anticorpos anti-receptor de insulina (fração β), anti-receptor de “insulin-like growth factor-I” (IGF-IR) (também fração β), anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-Shc, anti-JAK-2 e anti-STAT-1 e “immunoblotting” com anticorpo anti-fosfotirosina como descrito abaixo. Cada uma das variáveis acima foi avaliada em experimento repetidos entre 4 e 8 vezes.

Nos experimentos para estudo do efeito de *diabetes mellitus* (n=12/grupo), a estreptozotocina na dose de 58 mg/kg (Sigma, St Louis, MO) ou seu veículo, o citrato de sódio a 0,01 M (pH 4.5), foram aplicados na veia caudal dos animais do gênero masculino com 8 semanas de idade, 7 dias antes do experimento.

3.3. DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA, DA INSULINA SÉRICA E DO CICLO ESTRAL, E REALIZAÇÃO DO TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA

Amostras de sangue para medidas de glicose e insulina séricas foram colhidas da veia caudal dos ratos anestesiados. Da mesma forma, amostras para o teste de tolerância à insulina (ITT) foram colhidas no tempo 0 (basal) e após 4, 8, 12 e 16 minutos subsequente à injeção endovenosa de 10 μ M de insulina.

As amostras foram analisadas usando o método colorimétrico da glicose oxidase (Labtest, Lagoa Santa, MG) e os valores de absorbância obtidos foram avaliados por espectrofotometria (Fentro 432, São Paulo, Brasil) e comparados a valores de curva padrão.

O cálculo do índice de decaimento da glicose plasmática (K_{ITT}) foi obtido através da fórmula $0.693/t^{1/2}$, e o $t^{1/2}$ (tempo médio de decaimento da glicose plasmática em resposta à insulina) foi obtido do ângulo de inclinação das curvas descendentes de glicose, na fase linear de declínio em resposta à insulina, conforme anteriormente descrito (SAAD *et al.*, 1997).

A quantificação de insulina plasmática foi feita por método de radioimunoensaio, da mesma forma que para a quantificação nas lágrimas humanas, como descrito adiante.

Nos estudos comparando a influência do ciclo estral na fosforilação do receptor de insulina em glândulas lacrimais e salivares de ratas de 8 semanas (n=20), a determinação da fase do ciclo foi feita através da inoculação de cloreto de sódio a 0,9% no orifício vaginal e aspiração do lavado com ponteiros descartáveis, e examinando o material

aspirado por microscopia óptica, todas as manhãs por 9 dias, afim de determinar a fase do ciclo (i.e., estro, diestro -1, diestro -2 e pro-estro) e a progressão deste, de acordo com descrições prévias (MANDL, 1951; FREEMAN, 1988). Esse procedimento foi realizado antes da coleta dos tecidos para dar continuidade aos experimentos de comparação entre os gêneros masculino e feminino.

Os tecidos de animais adultos normais (n=6) destinados à imunohistoquímica foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos congelados até o dia do experimento. Os tecidos destinados a estudos de imunoprecipitação e “immunoblotting” foram homogenizados em tampão de extração - composto por Triton X-100 a 1%, 50 mM de Hepes (pH 7,4), 100 mM de pirofósforo de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 10 mM de vanadato de sódio, 2 mM de fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF) (Sigma, St. Louis, MO), e 0,1 mg de aprotinina por ml (Bayer, São Paulo, SP) - com Polytron, por 20 segundos, e após 30 minutos centrifugados a 12.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C. A quantificação de proteínas foi feita pelo método biureto (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil), com espectrofotômetro (Fentro 432, São Paulo, Brasil) e pelo cálculo do volume para obtenção de 3,0 mg de proteína por amostra, a partir da comparação da absorbância com valores de amostra-padrão com concentração conhecida, na frequência de onda de 545 nm.

3.4. TECIDOS HUMANOS

Amostras de córnea e conjuntiva de pacientes foram obtidas durante procedimento cirúrgico eletivo, após a obtenção de consentimento. Os tecidos foram congelados rapidamente e mantidos assim até o processamento para transferência para lâminas de microscopia. Esses estudos foram aprovados pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e observaram as orientações da Declaração de Helsinki.

3.5. IMUNOHISTOQUÍMICA

As amostras de tecido congeladas (i.e., glândulas lacrimais e salivares de rato e córnea e conjuntiva humana) foram colocadas em formas e embebidas em OCT-*tissue tek* (Miles, Elkhart, IN), resfriadas a -20°C , seccionadas na espessura de $6\text{ }\mu\text{m}$ (Microm HM 505 E, Carl Zeiss Inc., NY) e, em seguida, transferidas para lâminas de microscopia (Perfecta, São Paulo, SP, Brasil), previamente tratadas com polilisina-L (Sigma, St. Louis, MO).

Essas secções foram fixadas em acetona por 5 minutos a -20°C , depois encubadas com H_2O_2 a 0,1% por 5 minutos, lavadas em solução tampão fosfato, contendo 50 mM de fosfato de sódio, 150 mM de cloreto de sódio, com pH ajustado para 7,3. Em seguida foram processadas para imunohistoquímica como previamente descrito (ROCHA *et al*, 2000c).

Em resumo, as secções foram então expostas a soro de ovelha a 2% por 20 minutos a 4°C (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a fim de bloquear ligações inespecíficas. Em seguida, anticorpos policlonais de coelho anti-RI fração β ou anti-IGF-IR (contra a fração β para os estudos com glândulas lacrimais e salivares e contra a fração α nos estudos com córnea e conjuntiva)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), na concentração de $2\text{ }\mu\text{g}/\text{ul}$ em solução de tampão fosfato e albumina bovina a 0,3% (Gibco BRL) foram colocados sobre as lâminas e mantidos em câmara úmida a 4°C por 14 horas.

Após lavar com solução de tampão fosfato, as secções foram incubadas com anticorpo biotinizado de ovelha anti-IgG de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA) e depois de 35 minutos foram novamente lavadas com solução de tampão fosfato. O reagente complexo avidina-biotina (ABC) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) foi colocado e, depois de 40 minutos de incubação, seguiu-se nova lavagem com tampão fosfato, e por fim, as secções foram expostas por 5 minutos a uma solução reveladora contendo diaminobenzidina (DAB) e H_2O_2 (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Depois disso, as secções foram contracoradas com hematoxilina de Harris (Sigma, St. Louis, MO), cobertas com Entellan (Merck, Darmstald, Germany) e em seguida com uma lamínula de vidro. A documentação fotográfica foi feita com filme Kodak ASA 100 em microscópio Leica DMLS (Wetzlar, Alemanha), com magnificação de 200 e 400 vezes.

Foram usadas como controle positivo, lâminas com secções de fígado e como controle negativo secções nas quais o primeiro anticorpo foi substituído por anti-IgG de coelho pré-imune ou foi previamente encubado por 2 horas com o peptídeo bloqueador do anticorpo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

3.6. IMUNOPRECIPITAÇÃO

Dez µl de anticorpos policlonais anti-receptor de insulina (fração β), anti-receptor de “insulin-like growth factor-I” (IGF-I) (também fração β), anti-IRS-1 e -2, anti-Shc, anti-JAK-2 e anti-STAT-1 (disponíveis comercialmente na concentração de 200 µg/ml, pelo laboratório Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) foram encubados com extratos de glândula lacrimal a 4°C por 6 horas. Depois da adição de 50 µl de proteína A sepharose 6 MB as amostras permaneceram em repouso a 4°C, por mais 4 horas para permitir a imunorreacção e a precipitação do imunocomplexo. Em seguida à centrifugação a 4°C, por 15 minutos, a 12.000 rpm e sendo o sobrenadante desprezado, as amostras contendo o precipitado foram lavadas três vezes com solução tampão apropriada contendo 50 mM de Tris (pH 7,4), 2 mM de vanadato de sódio e Triton X-100 a 0,1%. O material foi ressuspenso com tampão de Laemmli, conforme descrito anteriormente (LAEMMLI, 1970; CARVALHO *et al.*, 1996).

3.7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Minutos antes da eletroforese, as amostras foram aquecidas a 100 °C, por 5 minutos, centrifugadas por 10 segundos e aplicadas aos géis de poliacrilamida acomodados em uma cuba. Os géis foram previamente preparados com duas fases: uma disposta superiormente chamada de fase de empilhamento, que continha 4,2 ml de água desionizada, 1,25 ml de acrilamida a 40%, 25 µl de Temed, 270 µl de APS a 10% e 5,6 ml de solução tampão de empilhamento (composto de EDTA a 4 mM, SDS a 10%, 50 mM de Trisma base, diluídos em água desionizada para completar 1 litro e pH de 6,7); e outra colocada inferiormente, chamada de fase de resolução, com acrilamida nas concentrações de 6,5 a

10%, composta de água desionizada, com volumes entre 3,32 e 1,9 ml, 1,8 ml de glicerol, entre 2,8 e 4,2 ml de acrilamida à 40%, Temed e APS nos mesmos volumes descritos acima, e 9 ml da solução tampão de resolução com pH de 8,9 (composto de EDTA a 4 mM, SDS a 2%, 750 mM de Trisma base e água destilada para completar 2 litros). Ao tampão de eletroforese - composto por 200 mM de Trisma base, 1,52 M de glicina, 7,18 mM de EDTA, SDS a 0,4%, diluídos em água desionizada - foi adicionado 50 µl de β-mercapto-etanol (Bio-Rad, Hercules, CA) para aumentar a permeabilidade a proteínas de alto peso molecular. Foi também aplicada em cada gel, em paralelo com as amostras em estudo, uma amostra contendo proteínas pré-marcadas para atuar como marcadores de peso molecular (Bio-Rad, Hercules, CA). A voltagem, inicialmente de 20 volts, foi sistematicamente ajustada para 100 volts, assim que as amostras passavam da fase de empilhamento para a fase de resolução, seguindo um método também já descrito (CARVALHO *et al.*, 1996).

3.8. TRANSFERÊNCIA E “IMMUNOBLOTTING”

Após a separação por eletroforese as proteínas isoladas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond ECL, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido), por gradiente elétrico de 120 volts, por 2 horas, em solução tampão de transferência composto por 25 mM de Trisma base, 192 mM de glicina, Metanol a 20%, SDS a 0,02% e água desionizada até o volume de 2 l, conforme descrito anteriormente (TOWBIN, STAEBLIN, GORDON, 1979). Essas membranas depois de bloqueadas para ligações inespecíficas em solução tampão bloqueadora contendo 0.5 g de leite em pó, 2,0 mg de azida sódica, Tris a 10 mM, NaCl a 150 mM e Tween 20 a 0.02% em 10 ml de água desionizada, por pelo menos duas horas, foram secas em temperatura ambiente e armazenadas a 4°C.

Em seguida, as membranas foram encubadas com 25 µl de anticorpo anti-tirosina fosforilada (200 µg/ml) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) por 4 horas a 22 °C, diluída em 10 ml de solução bloqueadora como a descrita acima e depois lavadas em 3 banhos de 10 minutos em solução similar sem a presença de leite. As membranas foram então encubadas com anticorpo policlonal anti-IgG de camundongo (1,25 µg) (Sigma, St.

Louis, MO), também em 10 ml de solução bloqueadora por 2 horas a 22 °C e após nova seção de lavagem, foram expostas a 2 µCi de proteína A marcada com I¹²⁵ (30 µCi/µg) (Amersham, Aylesbury, Reino Unido) em 10 ml de tampão bloqueador por 3 horas a 22 °C e novamente lavadas. Depois de secas e acondicionadas em plástico, as membranas foram expostas a filmes de Raio-X, a -80 °C, que foram revelados após dois a cinco dias.

A presença das proteínas isoladas foi avaliada após a remoção do material radioativo através da incubação das membranas por 30 minutos com 10 ml de solução contendo 200 mM de Glicina, 200 mM de NaCl e HCl até atingir o pH de 2,8, seguida pela adição de 1.5 ml de NaOH 1N, incubação por mais 30 minutos e lavagem com a solução tampão descrita acima por três vezes. Essa sequência, após ser repetida por três vezes, teve sua eficácia confirmada através da exposição das membranas a filme de Raio-X a -80 °C por 5 dias, a fim de confirmar a ausência de detecção radiográfica. Depois disso as membranas foram encubadas com 6.6 µg dos mesmos anticorpos usados na imunoprecipitação; anti-RI, anti-IRS-1, anti-Shc, anti-IGF-IR, anti-JAK-2, anti-STAT-1 e anti-IRS-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e foi reaplicado o protocolo de “immunoblotting”. Desta forma, foi possível confirmar com exatidão as bandas presentes no filme de raio-X, de acordo com a posição das mesmas em relação ao peso molecular esperado. Além disso, através desse método pode-se avaliar o nível de expressão protéica das diversas proteínas em cada uma das condições estudadas.

As bandas presentes no filme de raio-X, referentes à ligação do ¹²⁵I radiotativo nos anticorpos que por sua vez reconheceram proteínas específicas, foram, após a revelação, digitalizadas por aparelho “scanner” (Hewlett Packard ScanJet 5p) e armazenadas como arquivos do programa “Corel Photo Paint 5.0”, em um computador “Compaq Presario”. A quantificação dessas bandas foi realizada por densitometria óptica através do programa “NIH Image Analysis System”. Estudos preliminares foram conduzidos, a fim de assegurar leitura entre os pontos de saturação densitométrica.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados numéricos foram expressos com a média, seguida do erro-padrão médio (média $\pm$ E.P.M). Os experimentos comparativos de imunoprecipitação e “immunoblotting”, bem como parâmetros metabólicos e laboratoriais foram sempre conduzidos avaliando-se os grupos de animais em estudo (*i.e.*, diabéticos, senis e fêmeas) em paralelo com seus grupos-controle apropriados, usando o teste não-paramétrico U de Mann-Whitney, analisando os valores basais de fosforilação (sem insulina) entre os dois grupos e os valores obtidos em resposta ao estímulo com insulina. Os valores densitométricos foram expressos como porcentagem dos valores obtidos com o controle estimulado por insulina (convertidos em 100% em cada grupo de experimentos).

A comparação da expressão protéica do peptídeo em questão, nas quatro situações investigadas (*i.e.*, grupo de estudo, basal e depois de insulina e grupo-controle também na condição basal e após insulina) foi feita usando o teste ANOVA, assim como a análise da fosforilação do receptor de insulina nas quatro fases do ciclo estral das fêmeas.

A comparação dos níveis de insulina na lágrima humana, entre homens e mulheres, alimentados e em jejum foi feita também usando o teste ANOVA. Quando agrupados os gêneros e comparados os valores de insulina entre indivíduos em jejum e alimentados, o teste usado foi U de Mann-Whitney. A avaliação da relação entre insulina e proteína na lágrima de indivíduos alimentados foi feita através de regressão linear. Em todas as análises mencionadas foi usado o programa Statview 4.0 (Abacus, Berkeley, CA).

4. RESULTADOS

4.1. QUANTIFICAÇÃO DE INSULINA E PROTEÍNAS TOTAIS NA LÁGRIMA HUMANA

A insulina foi detectada em todas as amostras de lágrima analisadas, com concentração média de $0,404 \pm 0,129$ ng/ml. Não houve diferença significativa relacionada ao gênero, ao se comparar homens ($0,556 \pm 0,219$ ng/ml) e mulheres alimentados ($0,652 \pm 0,170$ ng/ml) ($p=0,24$) (Gráfico 1). Ao se comparar as lágrimas de homens ou mulheres em jejum com as lágrimas de homens ou mulheres alimentados, uma aparente redução foi observada tanto em homens ($0,108 \pm 0,038$ ng/ml) como em mulheres em jejum ($0,30 \pm 0,087$ ng/ml), mas novamente não houve diferença significativa ($p=0,368$), avaliada pelo teste ANOVA (Gráfico 1). Porém, ao se comparar indivíduos em jejum com alimentados, independente do gênero, uma vez que para essa variável não se detectou diferença, as médias de insulina na lágrima foram $0,601 \pm 0,138$ ng/ml para indivíduos alimentados e $0,204 \pm 0,055$ ng/ml para indivíduos em jejum, valores estes significativamente diferentes pela análise de Mann-Whitney U ($p=0,0397$) (Gráfico 2).

A avaliação da concentração de insulina na lágrima de três voluntários, a partir de amostras colhidas com intervalo de seis semanas, nas condições de jejum (média: $0,266$ ng/ml) ou alimentado, (média: $0,576$ ng/ml), mostrou diferença significativa, com elevação aproximada de 2,2 vezes na condição de alimentado ($p=0,049$).

Os valores médios de proteína na lágrima foram $4,61 \pm 0,79$ mg/ml, não havendo diferença significativa entre os grupos de homens ($4,71 \pm 0,79$ mg/ml) e mulheres ($4,50 \pm 0,50$ mg/ml) alimentados ($p=0,851$) ou em jejum (homens: $4,69 \pm 0,23$ mg/ml; mulheres: $5,08 \pm 0,604$ mg/ml, $p=0,631$). Também não houve correlação linear entre os níveis de insulina e proteína na lágrima dos indivíduos alimentados analisados conjuntamente ($r=0,083$, $p=0,2282$) (Gráfico 3).

4.2. IDENTIFICAÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA E DO RECEPTOR DE IGF-I EM GLÂNDULAS LACRIMAIS E SALIVARES DE RATO

As células epiteliais das glândulas lacrimais de rato expressam a subunidade β do receptor de insulina (RI) e do receptor de IGF-I predominantemente na região citoplasmática das células acinares (Figura 2). Foi também observada a presença dos receptores na membrana plasmática dessas células. Da mesma forma, o RI e IGF-IR foram identificados na membrana plasmática e no citoplasma de células epiteliais do ácinos e na região apical das células ductais das glândulas salivares.

Nas amostras-controle, substituindo o primeiro anticorpo por solução tampão com albumina bovina a 0.3% ou por soro pré-imune ou ainda bloqueando previamente o anticorpo anti-RI com amostra do peptídeo usado para gerar este anticorpo em coelhos, não houve coloração específica (Figuras 2 e 3).

4.3. IDENTIFICAÇÃO DO RI E IGF-IR EM CÓRNEA E CONJUNTIVA HUMANA

As células epiteliais da córnea expressam o RI na região citoplasmática e na membrana plasmática em todos os níveis da camada epitelial das quatro amostras estudadas (Tabela 2 e Figura 4). Além disso a subunidade α do IGF-IR foi também identificada predominantemente na região da membrana plasmática, o que está de acordo com a localização previamente descrita dessa subunidade do IGF-IR (JONES & CLEMMONS, 1995) (Figura 5).

A conjuntiva expressa o RI em todos os níveis da camada epitelial. A sua localização no citoplasma das células da conjuntiva, assim como dos outros tecidos descritos, pode se dever predominantemente a moléculas recém-sintetizadas ou a estoques reciclados dessa fração do receptor (Figura 4). O IGF-IR também foi identificado, predominantemente na membrana plasmática de todos os níveis da camada epitelial da conjuntiva bulbar (Figura 5).

Nas amostras-controle, em que o primeiro anticorpo foi inativado pela incubação prévia com seu peptídeo bloqueador ou foi substituído por tampão fosfato com albumina bovina a 0,3% ou soro pré-imune, não houve coloração específica (Figuras 4 e 5).

4.4. CURVA TEMPO-RESPOSTA À INSULINA EM GLÂNDULAS LACRIMAL E SALIVAR

O aumento da fosforilação em tirosina após a injeção de insulina (10 μ M) foi observado de forma tempo-dependente para o RI, IRS-1 e -2, Shc e STAT-1 entre 1 e 3 minutos nas glândulas lacrimal e salivar. O padrão de resposta foi menos claro e inconsistente para JAK-2, nos dois tecidos. A fosforilação foi máxima entre 30 segundos e 1 minuto para o RI e IRS-1 em glândula lacrimal e mais tardia, entre 3 e 5 minutos, para o IRS-2, Shc e STAT-1 (Figura 6). Nas glândulas salivares, a fosforilação máxima do RI, IRS-1 e -2 e Shc foi mais tardia, em torno de 3 minutos, e apenas STAT-1 e Shc já apresentavam níveis de fosforilação próximos ao máximo antes de 1 minuto. Nos dois tecidos, Shc foi o substrato que apresentou maiores níveis de fosforilação basal, sendo a isoforma Shc^{p52} (peso molecular de 52 Da) a mais consistentemente estimulada por insulina. A ativação de STAT-1, apesar da inconsistente detecção de JAK-2 ativado sugere que uma via alternativa, independentemente deste seja responsável pela indução da fosforilação do primeiro.

Em concentrações farmacológicas (10 μ M), a insulina induziu à fosforilação do IGF-IR, entre 30 segundos e 1 minuto em glândula lacrimal e entre 3 e 5 minutos em glândula salivar (Figura 6), fenômenos que se explicam pela similaridade entre os receptores destas moléculas e pela capacidade previamente documentada de a insulina se ligar ao IGF-IR *in vitro*, com afinidade 100 a 1000 vezes menor que ao seu receptor específico (ULLRICH *et al.*, 1986; STEELE-PERKINS *et al.*, 1988).

4.5. CURVA DOSE-RESPOSTA À INSULINA EM GLÂNDULAS LACRIMAL E SALIVAR

Nas glândulas lacrimal e salivar de rato, a fosforilação em tirosina induzida por insulina apresentou um padrão dose-dependente tanto para RI como para os elementos iniciais da cascata de sinalização. Depois de 1 minuto da injeção de insulina para a glândula lacrimal e 3 minutos para a salivar, os tecidos foram colhidos e submetidos ao protocolo de imunoprecipitação e “immunoblotting”. A estimulação foi máxima com doses até 10 μ M de insulina. Para o IGF-IR, apenas a dose máxima foi capaz de induzir fosforilação detectável, por outro lado, para algumas moléculas sinalizadores como RI e IRS-1 em glândulas lacrimais e IRS-2 e Shc em glândulas salivares, uma dose de insulina de 100 nM, induziu fosforilação igual ou superior à de 10 μ M (Figura 7).

4.6. INFLUÊNCIA DO *DIABETES MELLITUS* NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE INSULINA EM GLÂNDULAS LACRIMAIS E SALIVARES

Após uma semana do tratamento com estreptozotocina, os ratos estavam significativamente hiperglicêmicos e hipoinsulinêmicos comparados aos controles da mesma idade e gênero, tratados apenas com tampão citrato. Além disso, diferentemente desses, os diabéticos não apresentaram ganho de peso após a injeção (Tabela 3).

Para determinar o impacto do *diabetes* na fosforilação do RI e dos sinalizadores intracelulares Shc e STAT-1 nos tecidos em questão, animais diabéticos e grupo-controle (n=8/grupo) receberam injeção endovenosa de 10 μ M de insulina na veia cava inferior e suas glândulas lacrimais e salivares foram retiradas após 1 e 3 minutos respectivamente, como já descrito.

A comparação da quantidade de RI entre os animais diabéticos e controles não mostrou diferença significativa em ambos os tecidos (Tabela 4). Também não houve diferença entre os níveis de fosforilação basal em ambos os tecidos, apesar de uma tendência à menor fosforilação nos animais diabéticos. Porém, a análise densitométrica mostrou que, após o estímulo com insulina, a fosforilação do RI foi $25 \pm 8\%$ menor nas glândulas

lacrimalis de animais diabéticos ($p < 0,007$) e nas glândulas salivares houve uma redução, ainda que não significativa ($p = 0,21$) de $22 \pm 15\%$ (Figuras 8a e 8b).

A quantidade do peptídeo Shc não foi influenciada pelo *diabetes* ou pela injeção aguda de insulina, conforme observado pela análise densitométrica das membranas radiografadas, depois da reincubação dessas com o anticorpo anti-Shc (Tabela 4), da maneira descrita no capítulo metodologia. Além disso, não houve diferença significativa da sua fosforilação em condições basais ou sob o estímulo com insulina, em ambos os tecidos de ratos diabéticos comparados aos do grupo-controles (Figuras 8c e 8d).

A análise da densitometria mostrou também que a quantidade de STAT-1 (Tabela 4), bem como os níveis basais de fosforilação foram semelhantes nos dois grupos (Figuras 8e e 8f). Depois da injeção de insulina, a fosforilação do STAT-1 foi $51 \pm 15\%$ menor em glândulas lacrimalis de ratos diabéticos comparados a do grupo-controle ($p < 0,02$), porém, em glândulas salivares não se observou diferença significativa ($p = 0,36$) (Figuras 8e e 8f).

4.7. INFLUÊNCIA DO ENVELHECIMENTO NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE INSULINA EM GLÂNDULAS LACRIMAIS E SALIVARES

Os ratos de 20 meses eram euglicêmicos e hiperinsulinêmicos comparados aos animais-controle de 8 semanas e pesavam de 2 a 3 vezes mais que estes (Tabela 3).

Da mesma forma que para o *diabetes*, para determinar o impacto do envelhecimento sobre a fosforilação do RI, Shc e STAT-1, ratos de 8 semanas e de 20 meses receberam injeção de 100 μ l de insulina, na concentração de 10 μ M, na veia cava inferior, e as glândulas lacrimal e salivar foram retiradas após 1 e 3 minutos respectivamente.

O envelhecimento não alterou a quantidade da proteína RI nos dois tecidos (Tabela 4). Também não houve diferença nos níveis basais de fosforilação do RI (Figura 9a e 9b). Porém, a avaliação densitométrica indicou uma menor fosforilação do RI em glândulas lacrimalis de ratos senis, da ordem de $43,4 \pm 10,7\%$, comparada aos controles ($p = 0,0021$) e uma redução ainda maior, da ordem de $79,6 \pm 6,2\%$, em glândulas salivares ($p = 0,0002$) (Figuras 9a e 9b).

Da mesma forma, nem a quantidade de Shc, nem a sua fosforilação basal na glândula salivar, tampouco a sua fosforilação em resposta à insulina foram influenciadas pelo envelhecimento nos dois tecidos, (Tabela 4 e Figuras 9c e 9d). Porém a fosforilação basal na glândula lacrimal foi $40,3 \pm 8,7\%$ superior em ratos senis comparada à do grupo-controle de 8 semanas, diferença que foi estatisticamente significativa ($p=0,0096$) (Figura 9c).

A quantidade da proteína STAT-1 e a sua fosforilação basal também foram similares nos dois tecidos estudados dos ratos senis comparados ao grupo-controle (Tabela 4 e Figuras 9e e 9f). Após a injeção de insulina não houve diferença na fosforilação do STAT-1 entre ratos de 20 meses e de 8 semanas, porém a resposta na glândula salivar foi $55,4 \pm 8\%$ menor nos primeiros, comparada à do grupo-controle (Figuras 9e e 9f).

4.8. INFLUÊNCIA DO GÊNERO NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE INSULINA EM GLÂNDULAS LACRIMAIS E SALIVARES

Os ratos machos e as fêmeas nas quatro fases do ciclo estral tiveram curvas de decaimento da glicose em resposta à insulina (K_{ITT}) similares (machos: $4,25 \pm 0,55$; fêmeas $3,73 \pm 0,37$, $p=0,45$), bem como níveis plasmáticos de insulina similares (machos: $0,98 \pm 0,15$ ng/ml, fêmeas: $0,87 \pm 0,25$ ng/ml, $p=0,68$). Além disso, os machos apresentaram ao final da oitava semana de vida, peso significativamente maior que as fêmeas (machos: $263,4 \pm 8,26$; fêmeas $175,6 \pm 3,42$, $p<0,001$) (Tabela 3).

Da mesma forma que nos grupos anteriores, para determinar a influência do gênero na fosforilação dos peptídeos RI, Shc e STAT-1 em glândulas lacrimais e salivares de machos e fêmeas, amostras desses tecidos colhidas antes e depois do estímulo insulínico (1 minuto depois para a glândula lacrimal e 3 minutos depois para a glândula salivar) foram em seguida incubadas com anticorpos contra esses peptídeos para isolá-los por imunoprecipitação sendo que seus níveis de fosforilação foram determinados por “immunoblotting”.

Como nos modelos anteriores, a quantidade de RI e a sua fosforilação basal foram semelhantes nos dois grupos (Tabela 4 e Figuras 10a e 10b). Em contraste, a densitometria mostrou que o estímulo insulínico induziu a uma fosforilação do seu receptor $46,4 \pm 4,5$ % menor na glândula lacrimal de fêmeas comparada à dos machos ($p=0,009$). Da mesma forma, a fosforilação do RI em glândulas salivares foi $58,9 \pm 6,6$ % menor em fêmeas ($p=0,0339$) (Figuras 9a e 9b).

Para investigar se essa menor fosforilação do RI repercutia em elementos distais da via de sinalização de insulina, foram avaliados também neste modelo a fosforilação do Shc e STAT-1, antes e depois do estímulo insulínico.

Não houve diferença significativa na quantidade de Shc em relação ao gênero ou ao estímulo agudo com insulina (Tabela 4). Também os valores de fosforilação do Shc antes e depois da injeção de insulina não foram diferentes em ambos os tecidos nos dois grupos estudados ($p=0,80$ e $0,73$, respectivamente) (Figuras 10c e 10d).

Da mesma forma, não houve diferença significativa na quantidade de STAT-1, expressa em glândulas lacrimal ou salivar nos dois grupos (Tabela 4), e os níveis basais de fosforilação foram similares nos dois tecidos, assim como os níveis de fosforilação na glândula salivar em resposta à insulina (Figuras 10e e 10f). Houve uma tendência a uma menor fosforilação do STAT-1 em resposta à insulina em glândula salivar de fêmeas de $36,7 \pm 11,39$ % comparada à de macho, mas tal variação não alcançou diferença significativa ($p=0,06$) (Figuras 10e e 10f).

Para avaliar se as alterações hormonais relacionadas ao ciclo estral nas ratas exercia alguma influência nos mecanismos de ativação do RI nos dois tecidos em estudo, investigou-se o K_{ITT} e a fosforilação do RI em glândula lacrimal e salivar em cada uma das quatro fases do ciclo estral, determinadas da forma descrita no capítulo metodologia. A curva de decaimento da glicose e a análise densitométrica seguidas de avaliação estatística indicou que não houve diferença entre os valores obtidos, nas quatro fases do ciclo (estro, diestro-1, diestro-2 e proestro) (Figuras 11a e 11b e Tabela 5).

5. DISCUSSÃO

5.1. QUANTIFICAÇÃO DE INSULINA E PROTEÍNAS TOTAIS NA LÁGRIMA HUMANA

A presença de insulina no filme lacrimal levanta a questão sobre o seu papel fisiológico neste sítio e sobre o sua importância em condições patológicas como *diabetes*, resistência à insulina, olho seco e cicatrização corneana. A insulina, que utiliza em sua via de sinalização elementos comuns a vários fatores de crescimento com reconhecida função na proliferação do epitélio da córnea, como o IGF-I, EGF e NGF (ULLRICH & SCHLESSINGER, 1990; SASAOKA *et al.*, 1996, HALEGOUA & PATRICK, 1980, LAMBIASE *et al.*, 1998), tem sido utilizada como um elemento estimulador em culturas de epitélio corneano (LINDBERG *et al.*, 1993; PELLEGRINI *et al.*, 1997). Essas informações sugerem que a insulina pode ter também importantes funções sobre a superfície ocular *in vivo*, podendo inclusive produzir estímulos mitogênicos com propriedades terapêuticas como os fatores de crescimento mencionados.

Por outro lado, apesar das informações sobre a presença e o metabolismo de glicose nas células da superfície ocular de indivíduos normais e de que sua concentração é significativamente maior no filme lacrimal de diabéticos do que em indivíduos normais, pouco se conhece sobre os mecanismos de ação da insulina na superfície ocular ou no filme lacrimal (REIM *et al.*, 1967; AGUAYO *et al.*, 1988; MCNAMARA *et al.*, 1998; BARCAROLI *et al.*, 1997).

Alterações na superfície ocular e na estrutura corneana relacionadas ao *diabetes*, como olho seco, defeitos epiteliais e edema corneano têm sido reportadas (MCNAMARA *et al.*, 1998; SEIFART & STREMPER, 1994; RAMOS-REMUS *et al.*, 1994; HYNDIUK *et al.*, 1977; KENYON, 1982; AZAR *et al.*, 1992; TSUBOTA *et al.*, 1991). Estudos prévios relacionando essas alterações à hiperglicemia ou à denervação sensorial conseguiram responder a uma parte, mas não a todas as questões relacionadas às causas dessas alterações (MCNAMARA *et al.*, 1998; HYNDIUK *et al.*, 1977; ISHIDA *et al.*, 1984). Por outro lado, estudo usando ratos com *diabetes* induzido por estreptozotocina, falhou em demonstrar que a depleção de neurotransmissores seja um evento inicial na ceratopatia neurotrófica do diabético, sugerindo a possibilidade que a deficiência em outros fatores tróficos possa estar envolvida (MARFURT & ECHTENKAMP, 1995). Considerando que a insulina é

classificada como “o mais poderoso hormônio anabólico conhecido” (PESSIN & SALTIEL, 2000), sendo essencial para o desenvolvimento e crescimento tecidual e que sua secreção é drasticamente reduzida pelo tratamento com estreptozotocina (JUNOD *et al.*, 1967) , e também que esse hormônio é necessário para a proliferação de células epiteliais da córnea e da glândula lacrimal em cultura (LINDBERG *et al.*, 1993; PELLEGRINI *et al.*, 1997, HANN *et al.*, 1991), supõe-se que níveis reduzidos de insulina ou resistência periférica a este hormônio possa estar envolvida na patogênese das anormalidades de córnea, anteriormente referidas. A identificação de insulina em lágrima, bem como do seu receptor na córnea e na conjuntiva humana, podem servir de base para o entendimento futuro das suas ações na superfície ocular.

O tratamento de alterações de córnea com IGF-I tem se mostrado promissor tanto em estudos experimentais como clínicos (NISHIDA *et al.*, 1996; BROWN *et al.*, 1997). Além disso, estudos usando IGF-I marcado indicaram a presença do seu receptor em conjuntiva de coelhos - mas não do receptor de insulina (NARAWANE & LEE, 1995) - e também da expressão do RNA mensageiro do IGF-I, IGF-IR e de proteínas ligantes do IGF-I (IGFBP) em vários tecidos de rato, incluindo córnea e conjuntiva (BURREN *et al.*, 1996). Os resultados deste trabalho, indicando a presença do IGF-IR em células epiteliais de córnea e conjuntiva humana sugerem que esse fator de crescimento age diretamente sobre essas células, promovendo a proliferação e a migração das células epiteliais ou ainda de maneira parácrina sobre as células conjuntivais que a partir desse estímulo secretariam os elementos necessários para a cicatrização corneana.

Outra questão levantada pelo presente estudo é a respeito da origem da insulina presente no filme lacrimal. A similaridade com os níveis encontrados no sangue (GRODSKY, 1996) e a aparente influência modulatória da dieta na elevação da concentração de insulina na lágrima, sugerem que a insulina tenha atingido a superfície ocular, após ser secretada pelas células β -pancreáticas, distribuída pela corrente sangüínea e transportada ao filme lacrimal por uma ou mais fontes de secreção dos componentes da lágrima. Um controle mais próximo da ingesta calórica através de teste de tolerância a glicose (GTT) e do monitoramento da insulina plasmática deverão contribuir para a confirmação dessa hipótese. Uma outra alternativa, sugerida por estudos prévios indicando

que a insulina pudesse ser sintetizada por células neoplásicas (SECKL *et al.*, 1999), glândulas salivares (CARTER *et al.*, 1995) e outros órgãos como o fígado (ROSENWEIG *et al.*, 1980), mas cujas evidências de se tratar de um fenômeno fisiológico não são consensuais (VALLEJO *et al.*, 1984), seria a de que as glândulas lacrimais poderiam produzir insulina, assim como já existem descrições que estas seriam capazes de produzir outros hormônios como melatonina, prolactina e tiroxina (SULLIVAN *et al.*, 1998). Considerando uma ou as duas possibilidades para a secreção de insulina na superfície ocular e também que a meia-vida deste hormônio é de cerca de 10 minutos (GRODSKY, 1996), deve-se esperar que um fluxo constante e regular deste hormônio seja necessário para manter seus níveis satisfatórios, o que pode não ocorrer em situações adversas como *diabetes* ou olho seco, ou ainda na associação das duas.

A marcada diferença nas características da glândula e do filme lacrimal entre os gêneros masculino e feminino, que envolve uma relação complexa entre vários hormônios e fornece elementos para se compreender a mais alta prevalência de olho seco em mulheres (SULLIVAN *et al.*, 1998, SULLIVAN *et al.*, 1999), não se acompanha de níveis diferentes de insulina, como se pôde constatar. Diferentes achados poderiam ocorrer se a avaliação tivesse uma variação etária mais ampla ou fosse feita com lágrimas não estimuladas, como indicado por um estudo recente em que o EGF mostrou-se significativamente mais alto em homens (NAVA *et al.*, 1997).

A ausência de correlação linear entre os níveis de proteína total e insulina no filme lacrimal de indivíduos saudáveis alimentados indica que por representar uma fração pequena da proteína total, sua variação não se reflete sobre o conteúdo protéico total. Aqui também amostras populacionais maiores com uma faixa etária mais ampla, amostras de lágrima não estimulada ou ainda a comparação dos níveis de insulina com proteínas específicas secretadas na lágrima, como previamente reportado poderiam ser úteis para confirmar este achado (MCGILL *et al.*, 1984).

5.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ELEMENTOS PARTICIPANTES DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM GLÂNDULAS LACRIMAIS, SALIVARES, CÓRNEA E CONJUNTIVA

O crescimento, o metabolismo e a função das glândulas lacrimais e salivares são regulados por neurotransmissores e hormônios que ativam seus receptores específicos e iniciam cascatas de sinalização, envolvendo múltiplas e complexas interações intracelulares (DARTT, HODGES, ZOUKKHRI, 1998; PUTNEY JR, HUANG, BIRD, 1998; MENERAY & FIELDS 1998). O presente estudo demonstrou a presença de RI e IGF-IR nessas glândulas e demonstrou, ainda, que a insulina induz respostas tempo e dose-dependentes em vários elementos da sinalização intracelular. Esses dados indicam que a insulina, ao se ligar à subunidade α do seu receptor, leva à fosforilação em tirosina da subunidade β , desencadeando a fosforilação em tirosina de uma série de proteínas envolvidas em uma sequência de eventos que culminarão com os efeitos finais do hormônio naqueles tecidos.

Entre as proteínas envolvidas na sinalização da insulina, detectaram-se a presença de IRS-1, IRS-2 e Shc. Após sua ativação Shc, pode se ligar através do seu domínio SH2 ("src homology 2") a outras moléculas sinalizadoras como o "Growth factor receptor binding protein 2" (GRB2) e "Son-of-Sevenless" (SOS) levando à ativação da via da "mitogen activated protein kinase" (MAPK). Detectou-se ainda a proteína STAT, responsável por conectar sinais intracitoplasmáticos à transcrição gênica (KAHN, 1994; MYERS & WHITE, 1996).

Estudos prévios em outros tecidos e em culturas celulares, indicam que esses eventos induzem sinais divergentes, resultando em múltiplas interações intracelulares com as vias de sinalização de outros hormônios, fatores de crescimento e citocinas, desencadeando múltiplos eventos biológicos como captação de glicose e aminoácidos, síntese de glicogênio, proteínas, DNA e ácidos graxos, expressão gênica, proliferação e diferenciação celular, numa rede de sinalização complexa, com várias vias e diferentes mecanismos (MYERS & WHITE, 1996; LEONARD & O'SHEA, 1998).

Os sinalizadores IRS-1 e IRS-2, elementos-chave na transmissão do sinal da insulina, estão presentes nas glândulas lacrimais e salivares de rato. Ambos são fosforilados quase imediatamente após a injeção de insulina. Estudos com camundongos “knock-out” para os genes dessas proteínas, indicaram a participação delas no controle metabólico, crescimento tecidual e modulação do estímulo induzido pela insulina e pelo IGF-I (KAHN, 1994; ARAKI, ET AL., 1994; WHITERS ET AL., 1998).

O peptídeo JAK-2 está presente em pequenas quantidades nos tecidos examinados e a sua fosforilação em resposta à insulina ocorre de forma modesta e inconsistente, o que está de acordo com dados já publicados, em estudos com fígado de camundongos (CHEN *et al.*, 1997). Essas observações não concordam com achados anteriores reportando o padrão de ativação do JAK-2 em células em cultura, que por sua vez expressam níveis mais elevados de receptores de insulina do que tecidos em animais vivos, podendo indicar que a ativação do STAT-1 não passe exclusivamente pela via de JAK, como ocorre para as citocinas (DARNELL JR. *et al.*, 1994). Além disso, após a caracterização da fosforilação da JAK-2 em resposta à insulina em tecidos-alvo da ação insulínica, como fígado, músculo, gordura e coração, adicionaram-se poucas informações a respeito das interações destes peptídeos JAK/STAT em resposta à insulina *in vivo* (SAAD *et al.*, 1996; VELLOSO *et al.*, 1998). Também não está totalmente esclarecido quais os genes ou eventos finais modulados por STAT em resposta a hormônios, a fatores de crescimento e a citocinas nos diferentes tecidos-alvo desses agentes, e respostas tão antagônicas quanto mitose e inibição de proliferação já foram descritas (SCHINDLER & DARNELL JR., 1995; LEAMAN *et al.*, 1996).

O peptídeo Shc também foi identificado em glândulas lacrimais de rato, como previamente descrito (OTA *et al.*, 1998) e em glândulas salivares, com provável ação em processos de proliferação tecidual, conforme observados em estudos com culturas de células (PELICCI *et al.*, 1992). As observações deste trabalho indicam que a insulina induz a fosforilação de Shc, de forma tempo- e dose-dependente, nos dois tecidos estudados e que a fosforilação basal é elevada, provavelmente em resposta a outros estímulos ou mediado pelo trauma cirúrgico, ou via estimulação simpática. A causa dessa estimulação basal aumentada ou a razão da predominância da isoforma Shc^{p52} não foram alvo de investigação neste estudo.

A insulina induziu à fosforilação do IGF-IR, em concentrações farmacológicas, em glândula lacrimal e salivar, fenômenos, como dito anteriormente, que se explicam pela similaridade entre os receptores destas moléculas e pela capacidade previamente documentada de a insulina se ligar ao IGF-IR *in vitro*, com afinidade 100 a 1000 vezes menor que ao seu receptor específico (ULLRICH *et al.*, 1986; STEELE-PERKINS *et al.*, 1988). Considerando esta capacidade da insulina, IGF-I e outros fatores de crescimento como EGF e PDGF de ativar outras vias de sinalização, incluindo as de hormônios esteróides, a questão que permanece é: como as células em diferentes órgãos distinguem esses estímulos e respondem de maneira distinta a eles? Uma das respostas talvez esteja nas diferenças de número e de afinidade dos receptores em cada tecido, fatores intracelulares como expressão de diferentes isoformas de transdutores, diferentes sítios de acoplamento em moléculas sinalizadoras comuns, equilíbrio entre fosforilação em aminoácidos tirosina e serina/treonina, além de sua capacidade de interagir com outros sistemas de sinalização (CULIG *et al.*, 1995; BRANN, HENDRY, MAHESH, 1995; SASAOKA *et al.*, 1996; WATERS *et al.*, 1996; PAWSON & SAXTON 1999).

O envolvimento de distúrbios da sinalização intracelular na patogênese de diversas doenças e disfunções orgânicas tem sido objeto de estudo desde a caracterização dos mecanismos de sinalização envolvidos nas ações dos hormônios e dos fatores de crescimento. Além das síndromes decorrentes de mutações no receptor de insulina (MOLLER & FLIER, 1991), vários modelos animais de resistência à insulina, incluindo envelhecimento (CARVALHO *et al.*, 1996), gestação (SAAD *et al.*, 1997), obesidade, hipertensão arterial espontânea e ainda a resistência induzida farmacologicamente com dexametasona, adrenalina ou o *diabetes* induzido por estreptozotocina levaram a alterações na sinalização de insulina (SAAD, 1994; PÁEZ-ESPINOSA *et al.*, 1999). Modelos animais em que a desestruturação gênica alterou a expressão de proteínas envolvidas na sinalização da insulina em tecidos-alvo específicos estão ajudando a esclarecer a especificidade tecidual desses sinalizadores (BRÜNING *et al.*, 1998; KULKARNI *et al.*, 1999).

5.3 INFLUÊNCIA DO *DIABETES MELLITUS* NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE INSULINA EM GLÂNDULAS LACRIMAIS E SALIVARES

Os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese do olho e da boca seca não são bem compreendidos, porém a influência de vários hormônios sobre as glândulas lacrimais na síndrome de Sjögren e o impacto do *diabetes* induzido por estreptozotocina na secreção lacrimal de ratos já foram descritos (SULLIVAN *et al.*, 1998; SULLIVAN & HANN, 1989). Apesar de a estreptozotocina ser usada há vários anos para induzir diabetes através da destruição das células β -pancreáticas, apenas recentemente foi demonstrado que neste modelo ocorria também resistência à insulina e modulação da expressão e função de elementos envolvidos na sinalização da insulina (JUNOD *et al.*, 1967; DE FRONZO, HENDLER, SIMONSON, 1982; SAAD *et al.*, 1992). Os presentes resultados em ratos com *diabetes* induzido por estreptozotocina, sugerem um defeito na transmissão do sinal insulínico em glândulas lacrimais, conforme indicado pela reduzida fosforilação do receptor de insulina, que se propaga no ambiente intracelular pela via JAK-STAT, mas não na via de Shc. Essa diferença poderia ser explicada pelos altos níveis de fosforilação basal de Shc, conforme observado na Figura 6. A menor ativação do receptor de insulina em glândula lacrimal do diabético comparada ao controle, poderia afetar o crescimento tecidual da glândula e contribuir para a redução de volume e de proteína e imunoglobulinas na lágrima, previamente reportadas (SULLIVAN & HANN, 1989). O menor impacto do *diabetes* induzido por estreptozotocina nas glândulas salivares pode estar relacionado a um maior vigor desses órgãos em mamíferos roedores ou a uma reação tempo-resposta retardada à doença, comparada às glândulas lacrimais. De maneira geral, é interessante considerar que em uma situação de insulinopenia, os organismos promoveriam ajustes bioquímicos para reduzir o uso periférico da insulina e a atividade metabólica, e desta forma preservar a função dos órgãos mais diretamente envolvidos com a regulação metabólica como fígado e músculo (FOLLI *et al.*, 1993). Alterações na via tirosina-quinase de transmissão do sinal têm sido relacionadas a outras manifestações de doenças órgão-específicas como proliferação vascular secundária à oclusão da veia central da retina e doença de Alzheimer (HAYASHI, KIM, DE JUAN JR., 1999; HOYER, 1998).

Em resumo, a insulina exerce suas funções nas glândulas lacrimal e salivar, agindo através de uma série de etapas intracelulares de maneira semelhante a órgãos que tradicionalmente são reconhecidos como alvos da ação da insulina. As diferenças observadas podem estar relacionadas a ações específicas da insulina sobre cada tecido. A sinalização insulínica é afetada pelo *diabetes mellitus* em animais tratados com estreptozotocina, o que pode oferecer subsídios para os mecanismos moleculares da disfunção lacrimal nesta doença. Estudos futuros são necessários para explorar as repercussões fisiológicas das vias de sinalização prejudicadas em condições como o *diabetes*, o que poderia oferecer uma explicação sobre o mecanismo da redução da ação insulínica causando olho seco nesta doença.

5.4. INFLUÊNCIA DO ENVELHECIMENTO NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE INSULINA EM GLÂNDULAS LACRIMAIS E SALIVARES

Estudos prévios demonstrando a redução no volume e no conteúdo protéico na secreção salivar e lacrimal de ratos senis sugerem que a resposta reduzida a estímulos colinérgicos ou peptídeos estimuladores podem estar envolvidos nestes fenômenos (SREEBNY *et al.*, 1989; BAUM *et al.*, 1982; KIM *et al.*, 1980). Além disso, análises histológicas das glândulas lacrimais e salivares humanas indicam que alterações ductais e acinares são significativamente maiores em indivíduos mais velhos (DAMATO, *et al.*, 1984; VISSINK *et al.*, 1996). Os efeitos dessas alterações podem influenciar a saúde oral e da superfície ocular dos idosos, fazendo com que fiquem mais susceptíveis a olho seco e boca seca do que a população mais jovem como anteriormente reportado (SREEBNY ET AL., 1988; VISSINK *et al.*, 1996; MATHERS *et al.*, 1996; SCHEIN *et al.*, 1997).

Como demonstrado no presente estudo, os tecidos dos ratos senis estão expostos a concentrações plasmáticas de insulina mais altas que os do grupo-controle (adultos de 8 semanas), porém este aumento não é acompanhado por alteração nas concentrações do receptor ou de sinalizadores intracelulares como Shc e STAT-1. Considerando os efeitos tróficos da insulina sobre as células acinares lacrimais, demonstrados em células em cultura, e o peso similar das glândulas lacrimais em ratos senis comparados ao do grupo-controle

mais jovens (HANN *et al.*, 1991; SULLIVAN *et al.*, 1990), seria de se esperar a ocorrência de uma estimulação maior da insulina sobre os tecidos dos velhos comparados ao dos jovens, porém esses eventos, aparentemente contraditórios, podem ser explicados pelo fenômeno da resistência à insulina, que é em parte atribuído à deficiência na transmissão do sinal insulínico, mesmo em situações em que há excesso desse hormônio na circulação (SAAD, 1994). Os resultados indicam que a fosforilação do receptor de insulina em resposta à insulina está reduzida em glândulas lacrimais e salivares dos ratos senis e que esta redução repercute em etapas subseqüentes da sinalização como a fosforilação do STAT-1 em glândulas salivares.

A redução da atividade tirosina-quinase do receptor de insulina, sem a respectiva redução na expressão deste, já foi descrita em fígado e músculo de ratos senis e no sistema nervoso central (SNC) de pacientes com doença de Alzheimer (FRÖLICH *et al.*, 1998). Esses dados também concordam com ensaios *in vitro*, em que a atividade quinase do receptor de insulina foi menor em células provenientes de idosos comparada à de jovens, independentemente da quantidade de receptores expressos (KONO *et al.*, 1988; CARRASCOSA *et al.*, 1989).

Outros sistemas de sinalização, que utilizam a proteína-quinase C ou o AMPc como segundos-mensageiros, apresentam redução de atividade com o envelhecimento, que pode ser revertida através da modulação farmacológica, conforme observado em diferentes tecidos (WORTWEIN *et al.*, 1998; ISHIZUCA *et al.*, 1993; BACH *et al.*, 1999). Esses sistemas de sinalização são fundamentais para as funções das glândulas lacrimais (DARTT *et al.*, 1998).

Os resultados aqui apresentados indicam que a transmissão do sinal através do transdutor STAT-1 está reduzida em resposta à insulina nas glândulas salivares, uma vez que a sua fosforilação foi menor em ratos senis nesse tecido. Esse achado concorda com estudo anterior em que o envelhecimento levou a uma menor fosforilação do STAT-3 em fígado de camundongos em resposta ao hormônio de crescimento (GH) (XU & SONNTAG, 1996). Nesse estudo, a menor fosforilação do STAT-3 não estava relacionada à menor quantidade protéica de STAT-3 no fígado dos ratos senis e, por outro, lado era aumentada em resposta à

restrição calórica crônica. No presente estudo, a discrepância de achados entre glândulas lacrimais (que não tiveram diferença significativa na fosforilação do STAT, entre ratos senis e jovens) e glândulas salivares, pode indicar uma resposta tecido-específica ou ainda que as alterações na transmissão do sinal apresentam uma característica de regulação idade-dependente variável em diferentes tecidos.

O envelhecimento não afetou a fosforilação de Shc em resposta à insulina nos dois tecidos estudados, apesar de uma maior fosforilação basal em glândulas lacrimais. Esses dados estão de acordo com os achados prévios de elevada fosforilação basal de Shc em glândulas lacrimais e salivares de ratos normais (Figuras 5 e 6) e da fosforilação similar em resposta à insulina em outros tecidos de ratos velhos comparados aos do controle (PÁEZ-ESPINOSA *et al.*, 1999). Uma possível explicação para este fenômeno, seria que o envelhecimento e a hiperinsulinemia, ao reduzir a afinidade do receptor por seus sinalizadores intracelulares como o Shc, tornariam esse elemento mais disponível para estímulos oriundos de outras tirosina-quinases, daí sua elevada fosforilação basal em glândulas lacrimais e outros tecidos de rato senis (LAMMERS *et al.*, 1990, DI GUGLIELMO *et al.*, 1994, WATERS *et al.*, 1996).

Uma vez que a expressão do receptor de insulina e de STAT-1 foram similares em glândulas lacrimais e salivares de ratos jovens e velhos, pode-se afirmar que a menor fosforilação observada em animais senis não foi conseqüente à quantidade mas sim à incorporação de fosfato por molécula de substrato. Outros mecanismos que podem estar envolvidos incluem o aumento da atividade de fosfatases de fosfotirosinas (NADIV *et al.*, 1994; SHUAI, LIAO, SONG, 1996; HASPEL, SALDITT-GEORGIEFF, DARNELL JR, 1996) ou o aumento de peptídeos inibitórios como o PIAS ("protein inhibitor of activated STAT") e SS-1("STAT-induced STAT inhibitor") que atuariam sobre elementos de sinalização específicos (CHUNG *et al.*, 1997; STARR *et al.*, 1997). A resistência à insulina relacionada à obesidade observada nesses animais senis poderia contribuir uma vez que já foi observado que a restrição calórica é capaz de reverter a diminuição na fosforilação do receptor de insulina e do STAT (OLEFSKY & REAVEN, 1975; DAVIDSON & KARJALA 1978; XU & SONNTAG, 1996).

Em resumo, o envelhecimento reduz a fosforilação insulino-dependente do receptor de insulina em glândulas lacrimais e salivares de rato, fenômeno que pode repercutir em etapas subsequentes do processo de sinalização nesses tecidos. Essas alterações podem estar envolvidas nas disfunções lacrimais e salivares relacionadas ao envelhecimento.

5.5. INFLUÊNCIA DO GÊNERO NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE INSULINA EM GLÂNDULAS LACRIMAIS E SALIVARES

A ação moduladora da insulina sobre as vias de sinalização dos hormônios sexuais e vice-versa tem sido investigada em vários tecidos, mas a importância desta interação sobre a função fisiológica desses hormônios ainda é pouco conhecida (HOLMÄNG & BJÖRNTORP, 1992; GODSLAND *et al.*, 1993; SAAD *et al.*, 1997; RINCON *et al.*, 1996). Acredita-se que a inter-relação entre hormônios, fatores de crescimento e citocinas é um fenômeno que pode exercer um papel relevante no controle das funções celulares (BRANN *et al.*, 1995; JACOB *et al.*, 1999; VELLOSO *et al.*, 1996; WEIGEL, 1996). Essa inter-relação pode, por exemplo, contribuir para o aumento da resistência periférica à insulina em infecções ou para a associação comum entre *diabetes* e hipertensão (EPSTEIN, 1991; SECHI & BARTOLI, 1997). Quanto à possível interação entre hormônios sexuais e insulina nas glândulas lacrimais e salivares, existem indícios, uma vez que mulheres com *diabetes mellitus* tipo 2 apresentam mais comumente manifestação de boca e olho seco do que homens com a mesma condição (BULPITT *et al.*, 1998). Além disso, alterações histológicas e funcionais nessas glândulas de camundongos diabéticos não-obesos são mais intensas em fêmeas do que em machos, o que difere de outros modelos animais de doenças autoimunes sem *diabetes* (HU *et al.*, 1992; SULLIVAN *et al.* 1999; TODA *et al.*, 1999).

Os resultados deste trabalho demonstram que tanto em glândula lacrimal como salivar de ratos, a fosforilação do receptor de insulina é reduzida em fêmeas comparada a machos, em resposta ao estímulo insulínico. Estudos prévios, indicando que glândulas lacrimais são reguladas por hormônios sexuais, principalmente os andrógenos (SULLIVAN

et al., 1998), e também que hormônios sexuais interferem na sinalização insulínica, sugerem que os hormônios sexuais podem estar envolvidos na redução da sensibilidade à insulina observada em fêmeas aqui descrita (POLDERMAN *et al.*, 1994; RINCON *et al.*, 1996; SAAD *et al.*, 1997; TSIBRIS *et al.*, 1980).

Como esta redução na fosforilação do receptor em fêmeas poderia repercutir na cadeia de sinalização adiante, estudou-se a resposta de Shc e STAT-1 à insulina nessas glândulas. A decisão quanto a análise de Shc se deu por seu papel na proliferação celular em resposta a vários estímulos (PELICCI *et al.*, 1992; WARY *et al.*, 1996) e também porque estudos prévios indicam que o tratamento com corticóide aumenta a fosforilação do Shc em resposta à insulina (PÁEZ-ESPINOSA *et al.*, 1999). Além disso, estudos com células em cultura de câncer de mama, mostraram que o estradiol é capaz de ativar o Shc e outros elementos da via da MAPK, por mecanismos que passam pela ativação do seu receptor específico (MIGLIACCIO *et al.*, 1996), sugerindo uma influência dos hormônios esteróides sobre este elemento da sinalização insulínica em processos relacionados à multiplicação celular.

De forma semelhante, estudos das ações biológicas do STAT sugerem que esse esteja envolvido em processos de proliferação e diferenciação celular dependendo do estímulo ou sistema biológico estudado. Aqui também não havia informações se este elemento participante da sinalização de vários hormônios, fatores de crescimento e citocinas teria um papel na função ou na disfunção das glândulas lacrimais e salivares (SCHINDLER & DARNELL, 1995; LEONARD & O'SHEA, 1998). É interessante notar que o EGF, que divide vários mediadores intracelulares de sinalização com a insulina, apresenta uma interação cruzada com a progesterona, envolvendo Shc e STAT, com efeitos sinérgicos em células de glândulas mamárias que pode estar relacionada à proliferação do câncer de mama (LANGE *et al.*, 1998; RICHER *et al.*, 1998).

No presente trabalho não se identificou qualquer influência significativa do gênero na fosforilação do Shc e STAT-1 em resposta ao estímulo insulínico em glândulas lacrimais e salivares, apesar de uma tendência à redução da fosforilação do STAT-1 nas glândulas lacrimais de fêmeas, após a injeção de insulina. Esses achados não excluem a

influência de hormônios sexuais sobre estes ou outros elementos da sinalização intracelular, porém sugerem que a diferença na estimulação da sinalização intracelular não se propaga de maneira uniforme nas vias relacionadas à sinalização insulínica. Outras intercomunicações entre as vias insulínicas e as dos hormônios sexuais podem estar alteradas (WEIGEL, 1996).

A influência do ciclo menstrual sobre as ações insulínicas tem sido investigada em humanos com dados contraditórios, o que pode se dever a falhas no controle de outros parâmetros metabólicos e à sensibilidade variável na medida da ação insulínica (BONORA *et al.*, 1987; TOTH *et al.*, 1987; VALDES & ELKIND-HIRSCH, 1991). No presente trabalho, nem a curva de decaimento da glicose (K_{ITT}) em resposta à insulina, nem a fosforilação do receptor de insulina nas glândulas lacrimais e salivares apresentaram diferença significativa comparando os diferentes estágios do ciclo estral nas ratas fêmeas. Esses achados podem sugerir que os andrógenos mais que o estrógeno ou a progesterona possam ter influência na diferença de ativação do receptor de insulina, relacionada ao gênero em glândulas lacrimais e salivares.

Uma vez que tanto o receptor de insulina, como o Shc e o STAT-1 estão expressos em quantidades semelhantes nas glândulas lacrimais e salivares, é improvável que o gênero ou os hormônios sexuais tenham papel modulador sobre o padrão de expressão dessas proteínas. Outros mecanismos a serem investigados para explicar esta diferença entre os gêneros na ativação do receptor de insulina passam pela variação na atividade de fosfatases fosfotirosinas, interferências na ligação insulina-receptor ou na sua atividade quinase intrínseca.

Este trabalho também mostra que a fosforilação do receptor de insulina está diminuída em glândulas lacrimais e salivares de ratos do gênero feminino, em resposta à insulina. Este fenômeno pode estar relacionado a interações locais com hormônios sexuais, mais provavelmente andrógenos. Considerando os diversos efeitos da insulina sobre as funções celulares, estes dados podem ajudar a explicar a predominância de disfunções dessas glândulas no gênero feminino. Estudos futuros vão permitir o entendimento dos mecanismos reguladores dos hormônios sexuais sobre o receptor de insulina e também sobre a influência destes sobre outros elementos participantes da sinalização insulínica.

A melhor compreensão dos mecanismos de secreção de insulina na lágrima e de sua sinalização intracelular na superfície ocular e glândulas exócrinas poderão ajudar a entender a patogênese das alterações relacionadas ao *diabetes* e contribuir para um tratamento, seguro e eficaz dessas alterações.

6. CONCLUSÕES

1. A insulina está presente na lágrima humana e sua concentração é influenciada pelo estado alimentar mas não pelo gênero.

2. O receptor de insulina e do IGF-I estão presentes em glândulas lacrimais e glândulas salivares de ratos e na superfície ocular de humanos.

3. Entre os elementos participantes da via de sinalização celular da insulina identificou-se em glândulas lacrimais e glândulas salivares o IRS-1, IRS-2, Shc e STAT-1.

4. O *Diabetes mellitus*, o envelhecimento e o gênero influenciam as etapas iniciais das vias de sinalização da insulina em glândulas lacrimais e glândulas salivares de ratos.

7. SUMMARY

Insulin plays a major role in lacrimal and salivary gland function and may also regulate growth, metabolism and gene expression in those tissues and in ocular surface cells as well. In addition, cells isolated from the ocular surface and from exocrine glands depend on insulin for optimal survival in culture. The objectives of the present study were to investigate the presence of insulin in tears as well as the expression and functional status of the insulin receptor and elements participating in the insulin signaling pathway in ocular surface, salivary and lacrimal glands. Insulin was detected by radioimmunoassay in tear film of humans and apparently correlates with plasma insulin. Immunoperoxidase technique was used to localize insulin and IGF-I receptors in human cornea and conjunctiva and rat lacrimal and salivary glands. The insulin-induced phosphorylation in a time- and dose-dependent fashion was observed for insulin receptors IGF-IR, IRS-1, IRS-2, Shc and STAT-1, as evaluated by immunoprecipitation and immunoblotting procedures. The insulin receptor phosphorylation in response to insulin was lower in lacrimal glands of diabetic, senile and female rats as compared to controls. In salivary glands, similar findings were also observed in senile and female rats as compared to the controls. There was also a significantly lower phosphorylation of STAT-1 in response to insulin in lacrimal glands of diabetic rats and salivary glands of senile rats, compared to their respective controls. The present study suggests that insulin, by acting through elements of its signaling pathway may directly participate in the modulation of cell growth and survival in the ocular surface and lacrimal and salivary glands, and that insulin signaling in such sites may be influenced by diabetes mellitus, aging and gender.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

161

- AGUAYO, J.B.; MCLENNAN, I.J.; GRAHAM, C. JR.; CHENG, H.M. -Dynamic monitoring of corneal carbohydrate metabolism using high-resolution deuterium NMR spectroscopy. *Exp. Eye Res.*, **47**:337-43, 1988.
- AKRAMIAN, J.; WELDRICH, A.; NEPP, J.; SATOR, M. -Estrogen therapy in keratoconjunctivitis sicca. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **438**: 1005-10, 1998.
- ARAKI, E.; LIPES, M.A.; PATTI, M-E.; BRÜNING, J.C.; HAAG III, B.; JOHNSON, R.S.; KAHN, C.R. -Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, **372**:186-90, 1994.
- ASTOR, F.C.; HANFT, K.L.; CIOCON, J.O. -Xerostomia: a prevalent condition in the elderly. *Ear Nose Throat J.*, **78**: 476-79, 1999.
- AZAR, D.T.; SPURR-MICHAUD, S.J.; TISDALE, A.S., GIPSON, I.K. -Altered epithelial-basement membrane interactions in diabetic corneas. *Arch. Ophthalmol.*, **110**: 537-40, 1992.
- BACH, M.E.; BARAD, M.; SON, H.; ZHUO, M.; LU, Y.; SHIH, R.; MANSUY, I.; HAWKINS, R.D.; KANDEL, E.R. -Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:5280-85, 1999.
- BARCAROLI, M.P.; DEL BEATO, P., TANZILLI, P., DE MATTIA, G., VINGOLO, E.M. -Diabetes Mellitus and Dry eye syndrome: tear film glucose level in diabetic patients. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **38**(suppl. 38/4): S150, 1997.
- BAUM, B.J.; LEVINE, R.L.; KUYATT, B.L.; SOGIN, D.B. -Rat parotid gland amylase: evidence for alterations in an exocrine protein with increased age. *Mech. Ageing Dev.* **19**: 27-35, 1982.

- BONORA, E.; ZAVARONI, I.; ALPI, O.; PEZZAROSSA, A.; DALL'AGLIO, E.; COSCELLI, C.; BUTTURINI, U. -Influence of the menstrual cycle on glucose tolerance and insulin secretion. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **157**: 140-41, 1987.
- BORG, J-P. & MARGOLIS, B. -Function of PTB Domains. **Curr. Topics Microbiol. Immunol.**, **228**: 23-38, 1998.
- BRANN, D.W.; HENDRY, L.B.; MAHESH, V.B. -Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, **52**:113-33, 1995.
- BROMBERG, B.B. & WELCH, M. -Lacrimal protein secretion: comparison of young and old rats. **Exp. Eye Res.**, **40**:313-20, 1985.
- BROWN, S.M.; LAMBERTS, D.W.; REID, T.W.; NISHIDA, T.; MURPHY, C.J. - Neurotrophic and anhidrotic keratopathy treated with substance P and insulin like growth factor 1. **Arch. Ophthalmol.**, **115**: 926-27. 1997.
- BRÜNING, J.C.; MICHAEL, M.D.; WINNAY, J.N.; HAYASHAI, T.; HÖRSCH, D.; ACCILI, D.; GOODYEAR, L.J.; KAHN, C.R. -A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. **Mol. Cell**, **2**: 559-69, 1998.
- BULPITT, C.J.; PALMER, A.J.; BATTERSBY, C.; FLETCHER, A.E. -Association of symptoms of type 2 diabetic patients with severity of disease, obesity, and blood pressure. **Diabetes Care**, **21**: 111-15, 1998.
- BURREN, C.P.; BERKA, J.L.; EDMONDSON, S.R.; WERTHER, G.A.; BATCH, J.A. - Localization of mRNAs for insulin-like growth factor-I (IGF-I) , IGF-I receptor, and IGF binding proteins in rat eye. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **37**: 1459-68, 1996.
- CAFFERY, B.E.; RICHTER, D.; SIMPSON, T.; FONN, D.; DOUGHTY, M.; GORDON, K. -The Canadian Dry Eye Epidemiology Study. **Adv. Exp. Med. Biol.** **438**: 805-806, 1998.

- CARTER, D.A.; WOBKEN, J.D.; DIXIT, P.K.; BAUER, G.A. -Immunoreactive insulin in rat salivary glands and its dependence on age and serum insulin levels. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **209**: 245-50, 1995.
- CARRASCOSA, J.M.; RUIZ, P.; MARTINEZ, C.; PULIDO, J.A.; SATRUSTEGUI, J.; ANDRES, A. -Insulin receptor kinase activity in rat adipocytes is decreased during aging. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **160**:303-9, 1989.
- CARVALHO, C.R.O.; BRENELLI, S.L.; SILVA, A.C.; NUNES, A.L.B.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.A. -Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. **Endocrinology**, **37**:151-59, 1996.
- CHEN, J.; SADOWSKI, H.B.; KOHANSKI, R.A.; WANG, L-H. -Stat5 is a physiological substrate of the insulin receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**: 2295-300, 1997.
- CHUANG, L-M.; WANG, P.H.; CHANG, H.M.; LEE, S-C. -Novel pathway of insulin signaling involving Stat1 α in Hep3B cells. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, **235**: 317-20, 1997.
- CHUNG, C.D.; LIAO, J.; LIU, B.; RAO, X.; JAY, P.; BERTA, P.; SHUAI, K. -Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. **Science**, **278**:1803-805, 1997.
- CULIG, Z.; HOBISCH, A.; CRONAUER, M.V.; HITMAIR, A.; RADMAYR, C.; BARTSCH, G.; KLOCKER, H. -Activation of the androgen receptor by polypeptide growth factors and cellular regulators. **World J. Urol.**, **13**:285-89, 1995.
- DAMATO, B.E.; ALLAN, D.; MURRAY, S.B.; LEE, W.R. -Senile atrophy of the human lacrimal gland: the contribution of chronic inflammatory disease. **Br. J. Ophthalmol.**, **68**:674-80, 1984.
- DARNELL JR., J.E. -STATs and Gene regulation. **Science**, **277**:1630-35, 1997.

- DARNELL JR., J.E.; KERR, I.M.; STARK, G.R. -Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**, **264**: 1415-21, 1994.
- DARTT, D.A.; HODGES, R.R.; ZOULKHRI, D. -Signal transduction pathways activated by cholinergic and α -adrenergic agonists in the lacrimal gland. **Adv. Exp. Med. Biol.** **438**:113-22, 1998.
- DAVIDSON, M.B. & KARJALA, R.G. -Primary insulin antagonism of glucose transport in muscle from older-obese rat. **Metabolism**, **27**:1994-2005, 1978.
- DE FRONZO, R.A.; HENDLER, R.; SIMONSON, D. -Insulin resistance is a prominent feature of insulin-dependent diabetes. **Diabetes**, **31**:795-801, 1982.
- DI GUGLIELMO, G.M.; BAASS, P.C.; OU, W.-J.; POSNER, B.I.; BERGERON, J.J.M.-Compartmentalization of SHC, GRB2 and SOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. **EMBO J.**, **13**:4269-77, 1994.
- EMRICH, L.J.; SHLOSSMAN, M.; GENCO, R.J. -Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Periodontol.**, **62**: 123-30, 1991.
- EPSTEIN, F.H. -Insulin resistance-Mechanisms, syndromes and implications. **N. Engl. J. Med.**, **325**:938-48, 1991.
- ESMAELI, B.; HARVEY, J.T.; HEWLETT, B. -Immunohistochemical evidence for estrogen receptors in meibomian glands. **Ophthalmology**, **107**:180-84, 2000.
- FOLLI, F.; SAAD, M.J.A.; BACKER, J.M.; KAHN, C.R. -Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of animal models of insulin resistant and insulin deficient diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, **92**:1787-94, 1993.
- FREEMAN, M.E. - The ovarian cycle of the rat. In: Knobil, E. & Neill, J.D, ed. - **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1988. p.1893-1928.

- FRÖLICH, L.; BLUM-DEGEN, D.; BERNSTEIN, H.G.; ENGELSBERGER, S.; HUMRICH, J.; LAUFER, S.; MUSCHNER, D.; THALHEIMER, A.; TÜRK, A.; HOYER, S.; ZÖCHLING, R.; BOISSEL, K.W.; JELLINGER, K.; RIEDERER, P. - Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.*, 105:423-38, 1998.
- FUKUSHI, S.; MEROLA, L.O.; TANAKA, M.; DATILES, M.; KINOSHITA, J.H. - Reepithelialization of denuded corneas in diabetic rats. *Exp. Eye Res.*, 31: 611-21, 1980.
- GARCIA, S.M.L.; JECKEL NETO, E.; GARCÍA-FERNANDEZ, C. -*Embriologia*. Porto Alegre, Artes Médicas, 1991. 350p.
- GODSLAND, I.F.; GANGAR, K.; WALTON, C.; CUST, M.P.; WHITEHEAD, M.I.; WYNN, V.; STEVENSON, J.C. -Insulin resistance, secretion and elimination in postmenopausal women receiving oral or transdermal hormone replacement therapy. *Metabolism*, 42:846-53, 1993.
- GOEBBELS, M. -Tear secretion and tear film function in insulin dependent diabetics. *Br. J. Ophthalmol.* 84:19-21, 2000.
- GRODSKY, G.M. -Kinetics of insulin secretion: current implications. In: LE ROITH, D.; TAYLOR, S.I.; OLEFSKY, J.M. ed - **Diabetes Mellitus : a fundamental and clinical text**. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996: p.12-20.
- HALEGOUA, S. & PATRICK, J. -Nerve growth factor mediates phosphorylation of specific proteins. *Cell*, 22:571-81, 1980.
- HANN, L.E.; KELLEHER, R.S.; SULLIVAN, D.A. -Influence of culture conditions on the androgen control of secretory component production by acinar cell from the lacrimal gland. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 32: 2610-2621, 1991.

- HASPEL, R.L.; SALDITT-GEORGIEFF, M.; DARNELL JR., J.E. -The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon protein tyrosine phosphatase. **EMBO J.**, 15:6262-68, 1996.
- HAYASHI, A.; KIM, H.C.; DE JUAN, E. JR. -Alterations in protein tyrosine kinase pathways following retinal vein occlusion in the rat. **Curr Eye Res.** 18:231-39, 1999.
- HOLMÄNG, A. & BJÖRNTORP, P. -The effects of testosterone on insulin sensitivity in male rats. **Acta Physiol. Scand.**, 146:505-10, 1992.
- HOYER, S. -Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. **J. Neural Transm.**, 105:415-22, 1998.
- HU, Y.; NAKAGAWA, Y.; PURUSHOTHAM, K.R.; HUMPHREYS-BEHER, M.G. - Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. **Am. J. Physiol.**, 26:E607-E614, 1992.
- HYNDIUK, R.A.; KAZARIAN, M.D.; SCHULTZ, R.O.; SEIDEMAN, S. -Neurotrophic corneal ulcers in diabetes mellitus. **Arch. Ophthalmol.**, 95: 2193-96, 1977.
- ISHIDA, N.; RAO, G.; DEL CERRO, M.; AQUAVELLA, J.V. -Corneal nerve alterations in diabetes mellitus. **Arch. Ophthalmol.**, 102: 1380-84, 1984.
- ISHIZUCA, T., YAMAMOTO, M.; KAJITA, K.; YASUDA, K.; MIURA, K.; HERNANDEZ, H.; FARESE, R.V. -Differential effect of aging on protein kinase C activity in rat adipocytes and soleus muscle. **Metabolism**, 42:420-25, 1993.
- JACOB, K.K.; WININGER, E.; DIMINNI, K.; STANLEY, F.M. -The EGF response element in the prolactin promoter. **Mol. Cell. Endocrinol.**, 152:137-45, 1999.
- JACOBY, F. & LEESON, C.R. -The post-natal development of the rat submaxillary gland. **J. Anat.**, 93: 201-16 1959.

- JONES, J.I. & CLEMMONS, D.R. -Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Rev.**, **16**: 3-34, 1995.
- JUNOD, A.; LAMBERT, E.; ORCI, L.; PICTET, R.; GONET, A.E.; RENOLD, A.E.- Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **126**:201-205, 1967.
- KAHN, C.R. -Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. **Diabetes**, **43**:1066-84, 1994.
- KENYON, K.R. -Decision-making in the therapy of external eye diseases. **Ophthalmology**, **89**:44-51, 1982.
- KIM, S.K.; WEINHOLD, P.A.; HAN, S.S.; WAGNER, D.J. -Age-related decline in protein synthesis in the rat parotid gland. **Exp. Gerontol.**, **15**:77-85, 1980.
- KONO, S.; KUZUYA, H.; OKAMOTO, M.; NISHIMURA, H.; KOSAKI, A.; KJAKEHL, T.; INOVE, G.; MAEDA, I.; IMURA, H. -Changes in receptor kinase with aging in rat skeletal muscle and liver. **Am. J. Physiol.**, **254**:E27-E35, 1988.
- KULKARNI, R.N.; BRUNING, J.C.; WINNAY, J.N.; POSTIC, C.; MAGNUSON, M.A.; KAHN, C.R. -Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. **Cell**, **96**:329-39, 1999.
- LAEMMLI, U.K. -Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**:680-85, 1970.
- LAMBIASE, A.; RAMA, P.; BONINI, S.; CAPRIOGLIO, G.; ALOE, L. -Topical treatment with nerve growth factor for corneal neuropathic ulcers. **N. Eng. J. Med.**, **338**: 1174-80, 1998.
- LAMMERS, R.; VAN OBERGHEN, E.; BALLOTTI, R.; SCHLESSINGER, J.; ULLRICH, A.- Transphosphorylation as a possible mechanism for insulin and epidermal growth factor receptor activation. **J. Biol. Chem.**, **265**:16886-90, 1990.

- LANGE, C.A.; RICHER, J.K.; SHEN, T.; HORWITZ, K.B. -Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer. **J. Biol. Chem.**, **273**: 31308-16, 1998.
- LEAMAN, D.W.; LEUNG, S.; LI, X.; STARK, G.R. -Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines. **FASEB J.**, **10**:1578-88, 1996.
- LEITER, E.H.; PROCHAZKA, M.; COLEMAN, D.L. -The non-obese diabetic (NOD) mouse. **Am. J. Pathol.**, **128**: 380-83, 1987.
- LEMP, M.A. -Report of the National Eye Institute/ Industry Workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. **CLAO J.**, **21**:221-32, 1995.
- LEONARD, W.J. & O'SHEA, J.J. -JAKS and STATS: biological implications. **Annu. Rev. Immunol.**, **16**:293-322, 1998.
- LINDBERG, K.; BROWN, M.E.; CHAVES, H.V.; KENYON, K.R.; RHEINWALD, J.G. - *In vitro* propagation of human ocular surface cells for transplantation. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **34**: 2672-2679, 1993.
- MANDL, A.M. -The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. **J. Exp. Biol.**, **28**: 576-84, 1951.
- MARFURT, C.F. & ECHTENKAMP, S.F. -The effect of diabetes on neuropeptide content in the rat cornea and iris. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **36**:1100-1106, 1995.
- MATHERS, W.D.; LANE, J.A.; ZIMMERMAN, M.B. -Tear film changes associated with normal aging. **Cornea**, **15**:229-34, 1996.
- MCGILL, J.I.; LIAKOS, G.M.; GOULDING, N.; SEAL, D.V. -Normal tear protein profiles and age-related changes. **Br. J. Ophthalmol.** **68**:316-20, 1984.
- MCNAMARA, N.A.; BRAND, R.J.; POLSE, K.A.; BOURNE, W.M. -Corneal function during normal and high serum glucose levels in diabetes. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** **39**:3-17, 1998.

- MENERAY, M.A. & FIELDS, T.Y. -G protein coupling of receptor activation to lacrimal secretion. **Adv. Exp. Med. Biol.** 438:133-38, 1998.
- MIGLIACCIO, A.; DI DOMENICO, M.; CASTORIA, G.; DE FALCO, A.; BONTEMPO, P.; NOLA, E.; AURICCHIO, F. -Tyrosine kinase/p21^{ras}/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. **EMBO J.**, 15:1292-300, 1996.
- MOLLER, D.E. & FLIER, J.S. -Insulin resistance-Mechanisms, syndromes, and implications. **N. Engl. J. Med.**, 325:938-48, 1991.
- MURRAH, V.A. -Diabetes mellitus and associated oral manifestations: a review. **J. Oral Pathol.**, 14:271-81, 1985.
- MYERS, M.G. & WHITE, M.F. -Insulin signal transduction and the IRS proteins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 36:615-58, 1996.
- NADIV, O.; SHINITZKY, M.; MANU, H.; HECHT, D.; ROBERTS JR., C.T.; LE-ROITH, D.; ZICK, Y. -Elevated protein tyrosine phosphatase activity and increased membrane viscosity are associated with impaired activation of the insulin receptor kinase in old rats. **Biochem. J.**, 298:443-50, 1994.
- NARAWANE, M.A. & LEE, V.H.L. -IGF-I and EGF receptors in the pigmented rabbit bulbar conjunctiva. **Curr. Eye Res.**, 14: 905-10, 1995.
- NAVA, A.; BARTON, K.; MONROY, D.C.; PLUGFELDER, S.C. -The effect of age, gender, and fluid dynamics on the concentration of tear film epidermal growth factor. **Cornea**, 16:430-438, 1997.
- NAVIA, J.M. & NARKATES, A.J. -Dental Research. In: BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R.; WEISBROTH, S.H. -**The laboratory rat: research applications**. Nova York, Academic Press. 1980. Vol. 2; p. 59-74.

- NISHIDA, T.; NAKAMURA, M.; OFUJI, K. REID, T.W.; MANNIS, M.J.; MURPHY, C.J.
-Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea. **J. Cell. Physiol.**, **169**: 159-66, 1996.
- OLEFSKY, J.M. & REAVEN, G.M. -Effects of age and obesity on insulin binding to isolated adipocytes. **Endocrinology**, **96**:1486-98, 1975.
- ORCI, L.; AMHERDT, M.; MALAISSE-LAGAE, F.; RAVAZZOLA, M.; MALAISSE, W.J.; PERRELET, A.; RENOLD, A.E. -Islet cell membrane alteration by diabetogenic drugs. **Lab. Invest.**, **34**: 451-54 1976.
- OTA, I.; ZOUKHRI, D.; HODGES, R.R.; PARK, H.; DARTT, D.A. -Lacrimal gland alpha1-adrenergic agonists stimulate mitogen-activated protein kinase through activation of the EGF receptor. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **39**:S340, 1998. (Abstract).
- PÁEZ-ESPINOSA, E.V.; ROCHA, E.M.; VELLOSO, L.A.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J.A. -Insulin-induced tyrosine phosphorylation of Shc in liver, muscle and adipose tissue of insulin resistant rats. **Mol. Cell. Endocrinol.**, **156**:121-129, 1999.
- PAWSON, T. & SAXTON, T.M.- Signaling networks-Do all roads lead to the same genes? **Cell**, **97**:675-678, 1999.
- PELLEGRINI, G.; TRAVERSO, C.E.; FRANZI, A.T.; ZINGIRIAN, M.Z.; CANCEDA, R.; DE LUCA, M. -Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. **Lancet**, **349**: 990-993, 1997.
- PELICCI, G.; LANFRANCONE, L.; GRIGNANI, F.; MCGLADE, J.; CAVALLO, F.; FORNI, G.; NICOLETTI, I.; GRIGNANI, F.; PAWSON, T.; PELICCI, P.G. -A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. **Cell**, **70**:93-104 1992.
- PEPOSE, J.S. & UBELS, J.L. -The Cornea. In: HART, W.M. - **Adler's Physiology of the eye**. St. Louis. Mosby Year Book, 1992. p.29-70.

- PESSIN, J.E. & SALTIEL, A.R. -Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, 106:165-69, 2000.
- PILLION, D.J.; BARTLETT, J.D.; MEEZAN, E.; YANF, M.; CRAIN, J., GRIZZLE, W.E. -Systemic absorption of insulin delivered topically to the rat eye. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 32: 3021-27, 1991.
- PLUGFELDER, S.C. -Tear fluid influence on the ocular surface. **Adv. Exp. Med. Biol.** 438:611-17, 1998.
- POLDERMAN, K. H.; GOOREN, L.J.G.; ASSCHEMAN, H.; BAKKER, A.; HEINE, R.J. - Induction of insulin resistance by androgens and estrogens. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 79:265-71, 1994.
- PUTNEY JR., J.W.; HUANG, Y.; BIRD, G.S.J. -Calcium signaling in lacrimal acinar cells. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 438:123-28, 1998.
- RAMOS-REMUS, C.; SUAREZ-ALMAZOR, M.; RUSSELL, A.S. -Low tear production in patients with diabetes mellitus is not due to Sjögren's syndrome. **Clin. Exp. Rheumatol.**, 12:375-80, 1994.
- REIM, M.; LAX, F.; LICHT, H.; TURSS, R. -Steady state levels of glucose in different layers of the cornea, aqueous humor, blood and tears in vivo. **Ophthalmologica**, 154: 39-50, 1967.
- RICHER, J.K.; LANGE, C.A.; MANNING, N.G.; OWEN, G.; POWELL, R.; HORWITZ, K.B. -Convergence of progesterone with growth factor and cytokine signaling in breast cancer. **J. Biol. Chem.**, 273:31317-26, 1998.
- RINCON, J.; HOLMÄNG, A.; WAHLSTRÖM, E.O.; LÖNNROTH, P.; BJÖRNTORP, P.; ZIERATH, J.R.; WALBERG-HENRIKSSON, H. -Mechanisms behind insulin resistance in rat skeletal muscle after oophorectomy and additional testosterone treatment. **Diabetes**, 45:615-21, 1996.

- RIEGER, G. -The importance of the precorneal tear film for the quality of optical imaging. **Br. J. Ophthalmol.**, **76**:157-58, 1992.
- ROCHA, E.M.; ROCHA, F.J.; PENA, J.D.O. -Olho seco: receptores celulares e terapia farmacológica. In: Schor, N.; Boim, M.A.; Santos, O.P., ed. - **Clínica Médica: Medicina celular e molecular**. São Paulo. Sarvier, 2000a. In press.
- ROCHA, E.M.; PELEGRINO, F.S.A.; PAIVA, C.S.; VIGORITO, A.C.; SOUZA, C.A. - GvHD treated with autologous serum tears. **Bone Marrow Transplant.**, **25**: 1101-04, 2000b.
- ROCHA, E.M.; WICKHAM, L.A.; SILVEIRA, L.A.; KREENZER, K.L.; YU, F-S.; TODA, I.; SULLIVAN, B.D.; SULLIVAN, D.A. -Identification of androgen receptor protein and 5 α -reductase mRNA in human ocular tissues. **Br. J. Ophthalmol.**, **84**: 76-84, 2000c.
- ROCHA, F.J.; WICKHAM, L.A.; PENA, J.D.O.; GAO, J.; ONO, M.; LAMBERT, R.W.; KELLEHER, R.S.; SULLIVAN, D.A. -Influence of gender and the endocrine environment on the distribution of androgen receptors in the lacrimal gland. **J. Ster. Biochem. Mol. Biol.**, **46**:737-49, 1993.
- ROSENWEIG, J.L.; HAVRANKOVA, J.; LESNIAK, M.A.; BROWNSTEIN, M.; ROTH, J. -Insulin is ubiquitous in extrapancreatic tissues of rats and humans. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **77**:572-76, 1980.
- SAAD, M.J.A. -Molecular mechanisms of insulin resistance. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **27**:941-57, 1994.
- SAAD, M.J.A.; ARAKI, E.; MIRALPEIX, M.; ROTHENBERG, P.L.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. -Regulation of insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, **90**:1839-49, 1992.

- SAAD, M.J.A.; CARVALHO, C.R.O.; THIRONE, A.C.P.; VELLOSO, L.A. -Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. **J. Biol. Chem.**, 271:22100-104, 1996.
- SAAD, M.J.A.; MAEDA, L.; BRENELLI, S.L.; CARVALHO, C.R.O.; PAIVA, R.S.; VELLOSO, L.A. -Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. **Diabetologia**, 40:179-86, 1997.
- SAAD, M.J.A.; VELLOSO, L.A.; CARVALHO, C.R.O. -Angiotensin II induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. **Biochem. J.**, 310:741-44, 1995.
- SARAGAS, S.; ARFFA, R.; RABIN, B.; KRONISH, J.; MILLER, D.; MAYMAN, C. - Reversal of wound strength retardation by addition of insulin to corticosteroid therapy. **Ann. Ophthalmol.**, 17:428-30, 1985.
- SASAKA, T.; ISHIKI, M.; SAWA, T.; ISHIHARA, H.; TAKATA, Y.; IMAMURA, I.; USUI, I.; OLEFSKY, J.M.; KOBAYASHI, M. -Comparison of the insulin and insulin-like growth factor 1 mitogenic intracellular signaling pathways. **Endocrinology**, 137:4427-34, 1996.
- SATO, E.H. & SULLIVAN, D.A. -Comparative influence of steroid hormones and immunosuppressive agents on autoimmune expression in lacrimal glands of female mouse model of Sjögren's syndrome. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 35: 2632-42, 1993.
- SCHEIN, O.D.; MUÑOZ, B.; TIELSCH, J.M.; BADEEN-ROCHE, K.; WEST, S. - Prevalence of dry eye among the elderly. **Am. J. Ophthalmol.**, 124:723-28, 1997.
- SCHINDLER, C. & DARNELL JR., J.E. -Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. **Annu. Rev. Biochem.**, 64:621-51, 1995.

- SCOTT, A.M.; ATWATER, I.; ROJAS, E. -A method for the simultaneous measurement of insulin released and B-cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. **Diabetologia**, 21:470-75, 1981.
- SCHULTZ, G.S.; CIPOLLA, L.; WHITEHOUSE, A.; EIFERMAN, R.A.; WOOST, P.G.; JUMBLATT, M.M. -Growth factors and corneal endothelial cells: III. Stimulation of adult human corneal endothelial cell mitosis in vitro by defined mitogenic agents. **Cornea**, 11:20-27, 1992.
- SECHI, L.A. & BARTOLI E. -Mechanisms of insulin resistance leading to hypertension: what we can learn from experimental models. **J. Invest. Med.**, 45:238-51, 1997.
- SECKL, M.J.; MULHOLLAND, P.J.; BISHOP, A.E.; HALES, C.H.; GLASER, M.; WATKINS, S.; SECKL, J.R. -Hypoglycemia due to an insulin-secreting small-cell carcinoma of the cervix. **N. Eng. J. Med.**, 341:733-36, 1999.
- SEIFART, U. & STREMPER, I. -The dry eye and diabetes mellitus. **Ophthalmologe**, 91:235-39, 1994.
- SHUAL, K.; LIAO, J.; SONG, M.M. -Enhancement of antiproliferative activity of gamma interferon by the specific inhibition of tyrosine dephosphorylation of Stat1. **Mol. Cell. Biol.**, 16:4932-41, 1996.
- SREEBNY, L.M.; VALDINI, A.; YU, A.; BROOK, S. -Xerostomia. Part I: Relationship to other oral symptoms and salivary gland hypofunction. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol.**, 6:451-58, 1988.
- SREEBNY, L.M.; VALDINI, A.; YU, A.; BROOK, S. -Xerostomia. Part II: Relationship to nonoral symptoms, drugs, and diseases. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol.** 68:419-27, 1989.
- STARR, R.; WILSON, T.A.; VINEY, E.M.; MURRAY, L.J.; RAYNER, J.R.; JENKINS, B.J.; GONDA, T.J.; ALEXANDER, W.S.; METCALF, D.; NICOLA, N.A. -A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. **Nature**, 387:917-21, 1997.

- STEELE-PERKINS, G.; TURNER, J.; EDMAN, J.C.; HARI, J.; PIERCE, S.B.; STOVER, C.; RUTTER, W.J.; ROTH, R.A. -Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J. Biol. Chem.*, **263**:11486-92, 1988.
- SULLIVAN, D.A.; & HANN, L.E. -Hormonal influence on the secretory immune system of the eye: endocrine impact on the lacrimal gland accumulation and secretion of IgA and IgG. *J. Steroid. Biochem.* **34**:253-62, 1989.
- SULLIVAN, D.A.; HANN, L.E.; YEE, L.; ALLANSMITH, M.R. -Age- and gender-related influence on the lacrimal gland and tears. *Acta Ophthalmol. Scand.*, **68**:188-94, 1990.
- SULLIVAN, D.A. & SATO, E.H. -Potential therapeutic approach for the hormonal treatment of lacrimal gland dysfunction in Sjögren's syndrome. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **64**:9-16, 1992.
- SULLIVAN, D.A.; WICKHAM, L.A.; KRENZER, K.L.; ROCHA, E.M.; TODA, I. - Aqueous tear deficiency in Sjögren's syndrome: possible causes and potential treatment. In PLEYER, U.; HARTMANN, U.; STERRY, W. ed. -**Oculodermal Diseases-Immunology of Bullous Oculo-Muco-Cutaneous Disorders**. Buren, The Netherlands: Acolus press. 1997. p.95-152.
- SULLIVAN, D.A.; WICKHAM, L.A.; ROCHA, E.M.; KELLEHER, R.S.; SILVEIRA, L.A.; TODA, I. -Influence of gender, sex steroids hormones and the hypothalamic-pituitary axis on the structure and function of the lacrimal gland. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **438**:11-42, 1998.
- SULLIVAN, D.A.; WICKHAM, L.A.; ROCHA, E.M.; KRENZER, K.L.; SULLIVAN, B.J.; STEAGALL, R.; CERMAK, J.M.; DANA, M.R.; ULLMAN, M.D.; SATO, E.H.; GAO, J.; ROCHA, F.J.; ONO, M.; SILVEIRA, L.A.; LAMBERT, R.W.; KELLEHER, R.S.; TOLLS, D.B.; TODA, I. -Androgens and dry eye in Sjögren's syndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **876**: 312-24, 1999.

- SUN, X.J.; WANG, L.M.; ZHANG, Y.; YENUSH, L.; MYERS, M.G.; GLASHEEN, E.; LANE, W.S.; PIERCE, J.H.; WHITE, M.F. -Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature*, **377**:173-77, 1995.
- THIRONE, A.C.P.; CARVALHO, C.R.O.; BRENELLI, S.L.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.A. -Effect of chronic growth hormone treatment on insulin signal transduction in rat tissues. *Mol. Cel. Endocrinol.*, **130**:33-42, 1997.
- THOMSON, W.M.; CHALMERS, J.M.; SPENCER, A.J.; KETABI, M. -The occurrence of xerostomia and salivary gland hypofunction in a population-based sample of older South Australians. *Spec. Care Dentist.*, **19**: 20-23, 1999.
- TODA, I.; SULLIVAN, B.D.; ROCHA, E.M.; SILVEIRA, L.A.; WICKHAM, L.A.; SULLIVAN, D.A. -Impact of gender on exocrine gland inflammation in mouse models of Sjögren's syndrome. *Exp. Eye Res.*, **69**: 355-66, 1999.
- TOTH, E.L.; SUTHIJUMROON, A.; CROCKFORD, P.M.; RYAN, E.A. -Insulin action does not change during the menstrual cycle in normal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **64**:74-80, 1987.
- TOWBIN, H.; STAEBLIN, J.; GORDON, J. -Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**:4350-54, 1979.
- TSENG, S.C.G. & TSUBOTA, K. -Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am. J. Ophthalmol.*, **124**:825-35, 1997.
- TSIBRIS, J.C.M.; RAYNOR, L.O.; BUHL, W.C.; BUGGIE, J.; SPELLACY, W.N. -Insulin receptors in circulating erythrocytes and monocytes from women on oral contraceptives or pregnant women near term. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **51**:711-17, 1980.
- TSUBOTA, K.; YAMADA, M.; NAOI, S. -Specular microscopic observation of human corneal epithelial abnormalities. *Ophthalmology*, **98**: 184-91, 1991.

- TSUBOTA, K.; GOTO, E.; FUJITA, H.; ONO, M.; INOUE, H.; SAITO, I.; SHIMMURA, S. -Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. **Br. J. Ophthalmol.**, **83**:390-395, 1999.
- ULLRICH, A.; BELL, J.R.; CHEN, E.Y.; HERRERA, R.; PETRUZZELLI, L.M.; DULL, T.J.; GRAY, A.; COUSSENS, L.; LIAO, Y-C.; TSUBOKAWA, M.; MASON, A.; SEEBURG, P.H.; GRUNFELD, C.; ROSEN, O.M.; RAMACHANDRAN, J. - Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. **Nature**, **313**: 756-61, 1985.
- ULLRICH, A.; GRAY, A.; TAM, A.W.; YANG-FENG, T.; TSOBOKAWA, M.; COLLINS, C.; CHEN, E.; JACOBS, S.; FRANCKE, U.; RAMACHANDRAN, J.; FUJITA-YAMAGUCHI, Y. -Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define fuctional specificity. **EMBO J.**, **5**:2503-12, 1986.
- ULLRICH, A. & SCHLESSINGER, J. -Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. **Cell**, **61**: 203-12, 1990.
- VALDES, C.T. & ELKIND-HIRSCH, K.E. -Intravenous glucose tolerance test-derived insulin sensitivity changes during the menstrual cycle. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **72**:642-46 1991.
- VALLEJO, G.; MEAN, P.M.; GAYNOR, D.H.; DEVLIN, J.T.; ROBBINS, D.C. - Characterization of immunoreactive insulin in human saliva: Evidence against production *in situ*. **Diabetologia**, **27**: 438-40, 1984.
- VELLOSO, L.A.; CARVALHO, C.R.O.; ROJAS, F.A.; FOLLI, F.; SAAD, M.J.A. -Insulin signalling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway. **Cardiovasc. Res.**, **40**:96-102, 1998.

- VELLOSO, L.A.; FOLLI, F.; SUN, X.J.; WHITE M.F.; SAAD, M.J.A.; KAHN, C.R. - Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93:12490-95, 1996.
- VISSINK, A.; SPIJKERVET, F.K.L.; AMERONGEN, A.V.N. -Aging and saliva: a review of the literature. **Spec. Care Dentist**. 16:95-103, 1996.
- WATERS, S.B.; CHEN, D.; KAO, A.W.; OKADA, S.; HOLT, K.H.; PESSIN, J.E. -Insulin and epidermal growth factor receptors regulate distinct pools of Grb2-SOS in the control of Ras activation. **J. Biol. Chem.**, 271:18224-30, 1996.
- WHITE, M.F. & YENUSH, L. -The IRS-Signaling system: A network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. **Curr. Topics Microbiol. Immunol**. 228:179-208 1998.
- WARY, K.K.; MAINIERO, F.; ISAKOFF, S.J.; MARCANTONIO, E.E.; GIANCOTTI, F.G. -The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. **Cell**, 87: 733-43, 1996.
- WEIGEL, N.L. -Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. **Biochem. J.**, 319: 657-67, 1996.
- WITHERS, D.J.; GUTIERREZ, J.S.; TOWERY, H.; BURKS, D.J.; REN, J.M.; PREVIS, S.; ZHANG, Y.; BERNAL, D.; PONS, S.; SHULMAN, G.I.; BONNER-WEIR, S.; WHITE, M.F. -Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature**, 39:900-904, 1998.
- WILSON, S.E. -Lacrimal gland epidermal growth factor production and the ocular surface. **Am. J. Ophthalmol.**, 111:763-65, 1991.
- WOOST, P.G.; BRIGHTWELL, J.; EIFERMAN, R.A.; SCHULTZ, G.S. -Effect of growth factors with dexamethasone on healing of rabbit corneal stromal incisions. **Exp. Eye Res.** 40:47-60, 1985.

WORTWEIN, G.; YU, J.; TOLIVER-KINSKY, T.; PEREZ-POLO, J.R. -Responses of young and aged rat CNS to partial cholinergic immunolesions and NGF treatment. *J. Neurosci. Res.*, 52:322-33, 1998.

XU, X. & SONNTAG, W.E. -Growth hormone-induced nuclear translocation of STAT-3 decreases with age: modulation by caloric restriction. *Am. J. Physiol.*, 34:E903-E909, 1996.

Figure 1. Schematic diagram of the experimental setup. The subjects were seated in a comfortable position and viewed the target through a video screen. The target was a small light source (LED) that was controlled by a computer. The subjects were instructed to move their hand to the target as quickly and accurately as possible. The distance between the hand and the target was 40 cm. The subjects were also instructed to maintain a constant force of 10 N on the handle throughout the movement. The force was measured by a force transducer (F101, Ohaus Corp., Stamford, CT, USA) that was connected to a computer. The computer also recorded the time taken for the hand to reach the target. The subjects were given 10 practice trials before the data collection began. The data were then analyzed using a one-way ANOVA to determine the effect of the target distance on the time taken to reach the target.

Tabela 1. Características da população investigada para análise de insulina no filme lacrimal. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM.

<i>Voluntários</i>	<i>Homens</i>	<i>Mulheres</i>
Alimentados/ Em jejum (n)	12/5	11/05
Idade (média em anos)	33,17 $\pm$ 4,5	30,62 $\pm$ 5,2
Volume de lágrima (μ l)	46,4 $\pm$ 8,7	53,3 $\pm$ 7,8
Proteína (mg/ml)	4.71 $\pm$ 0.79	4.50 $\pm$ 0.50

Tabela 2. Características dos tecidos humanos usados para identificação do receptor de insulina e do receptor de IGF-I.

<i>Tecido</i>	<i>Iniciais</i>	<i>Idade/ Gênero</i>	<i>Doença</i>	<i>Anti-RI</i>	<i>Anti-IGF-IR</i>	<i>Controles Negativos</i>
Córnea	SDS	36/M	Doador	+	+	-
Córnea	VAPS	34/F	Ceratocone	+	+	-
Córnea	AAL:	18/M	Ceratocone	+	+	-
Córnea	MFSB	27/F	Opacidade estromal	+	+	-
Conjuntiva	JS	18/F	Catarata	+	+	-
Conjuntiva	MJS	51/M	Catarata	+	+	-
Conjuntiva	GLV	77/F	Catarata	+	+	-

Tabela 3. Peso, glicemia, insulina sérica e K_{ITT} dos grupos de ratos usados nos experimentos considerando-se *diabetes*, envelhecimento e gênero. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM.

Grupo	n	Peso corporal (g)	Glicose plasmática (mg/dl)	Insulina sérica(μ U/ml)	K_{ITT}
Diabético-STZ	8	167 $\pm$ 10 *	364 $\pm$ 22 *	4,2 $\pm$ 0,6 *	-
Velho (20 meses)	8	401 $\pm$ 148 *	124 $\pm$ 11	64,5 $\pm$ 14,5 *	2,29 $\pm$ 0,63 *
Fêmeas	8	175,62 $\pm$ 3,42 *	121 $\pm$ 12	19,6 $\pm$ 5,2	3,85 $\pm$ 0,45
Grupo-Controle (machos de 2 meses)	24	208 $\pm$ 8	114 $\pm$ 15	20,4 $\pm$ 2,9	4,25 $\pm$ 0,55

* $p < 0,05$ comparado aos valores obtidos no grupo-controle.

Tabela 4. Densitometria da expressão de proteína nas glândulas lacrimais e salivares nos grupos de ratos diabéticos, senis e fêmeas comparada a do grupo-controle, analisada em paralelo. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM.

Grupo	Glândula Lacrimal			Glândula Salivar		
	RI	Shc	STAT	RI	Shc	STAT
Diabético-STZ	739,0 $\pm$ 22,0	472 $\pm$ 62,8	1675 $\pm$ 75,5	660 $\pm$ 34,8	493 $\pm$ 33,7	634,5 $\pm$ 15,8
Controle	793,5 $\pm$ 59,5	595,5 $\pm$ 100,3	1573 $\pm$ 120,3	687 $\pm$ 111	494 $\pm$ 56,1	613 $\pm$ 31,6
2 meses	663 $\pm$ 59,5	344,5 $\pm$ 72,2	240,3 $\pm$ 67,2	615 $\pm$ 111	455,5 $\pm$ 84,1	232,8 $\pm$ 47,6
20 meses	760,5 $\pm$ 104,3	308 $\pm$ 74	292,3 $\pm$ 74,2	404,8 $\pm$ 81,5	310 $\pm$ 114,5	290 $\pm$ 21,7
Machos	476,5 $\pm$ 217,1	270 $\pm$ 71,6	568,7 $\pm$ 175,5	437,7 $\pm$ 60,7	789,5 $\pm$ 129,2	265,7 $\pm$ 54,0
Fêmeas	605,8 $\pm$ 165,9	139,5 $\pm$ 59,1	575 $\pm$ 120,3	351,8 $\pm$ 87,5	907,3 $\pm$ 149,6	351,0 $\pm$ 190,5

Tabela 5. K_{ITT} de ratos machos e fêmeas nas quatro fases do ciclo estral. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM.

<i>Grupos</i>	<i>n</i>	<i>K_{ITT}</i>
Machos	8	4.25 $\pm$ 0.55
Fêmeas		
Estro	5	3.46 $\pm$ 0.51
Diestro-1	5	4.31 $\pm$ 0.34
Diestro-2	5	3.75 $\pm$ 0.47
Proestro	5	3.86 $\pm$ 0.54

Gráfico 1. Comparação entre os níveis de insulina no filme lacrimal de voluntários masculinos e femininos, alimentados e em jejum

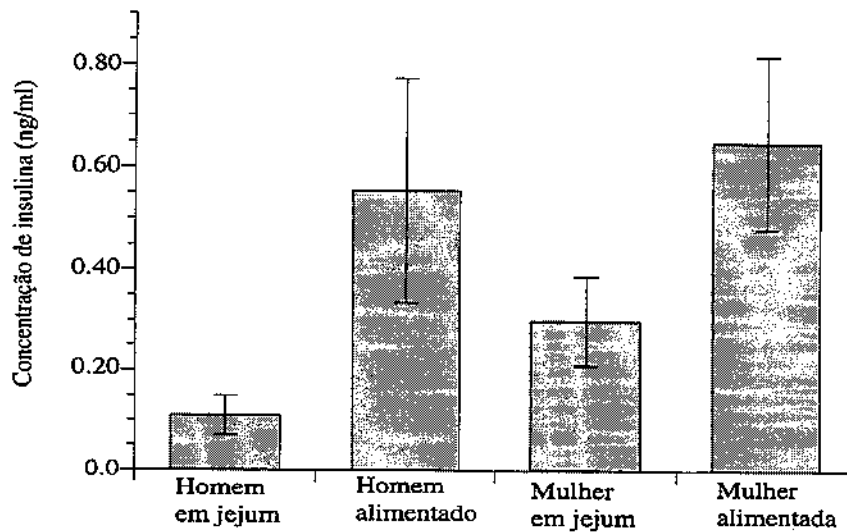


Gráfico 2. Comparação entre os níveis de insulina na lágrima de voluntários alimentados e em jejum

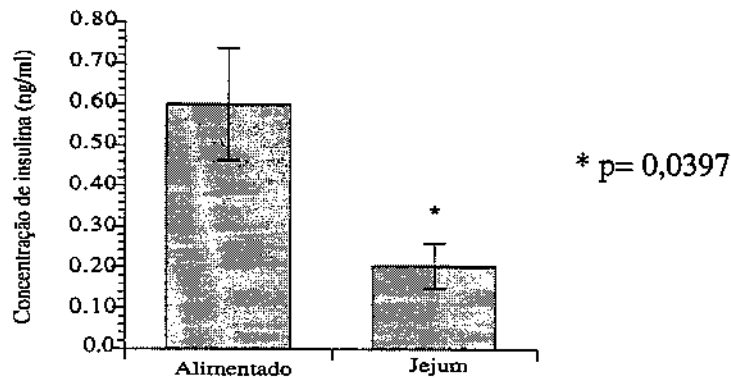


Gráfico 3. Relação entre os níveis de insulina e proteína na lágrima humana

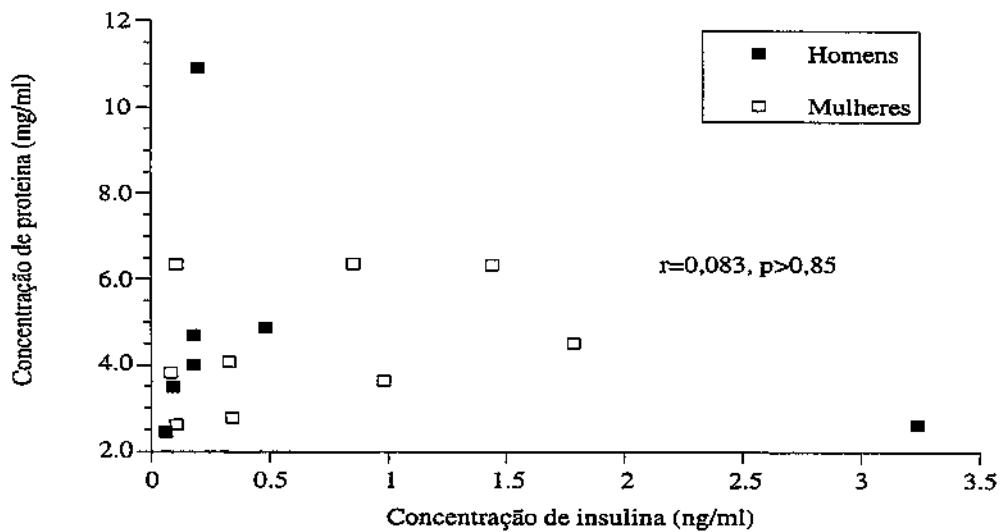


Figura1. Transmissão do sinal da insulina. Representação esquemática de uma célula em que a ligação da insulina ao seu receptor (RI), uma proteína transmembrana, com estrutura heterotetramérica induz a ativação deste e a subsequente ativação de vias de sinalização citoplasmáticas dirigidas a atividade metabólica (representada pelo GLUT-4 promovendo a captação de glicose) e a transmissão do sinal insulínico ao núcleo celular onde promove eventos como transcrição gênica e controle da proliferação celular.

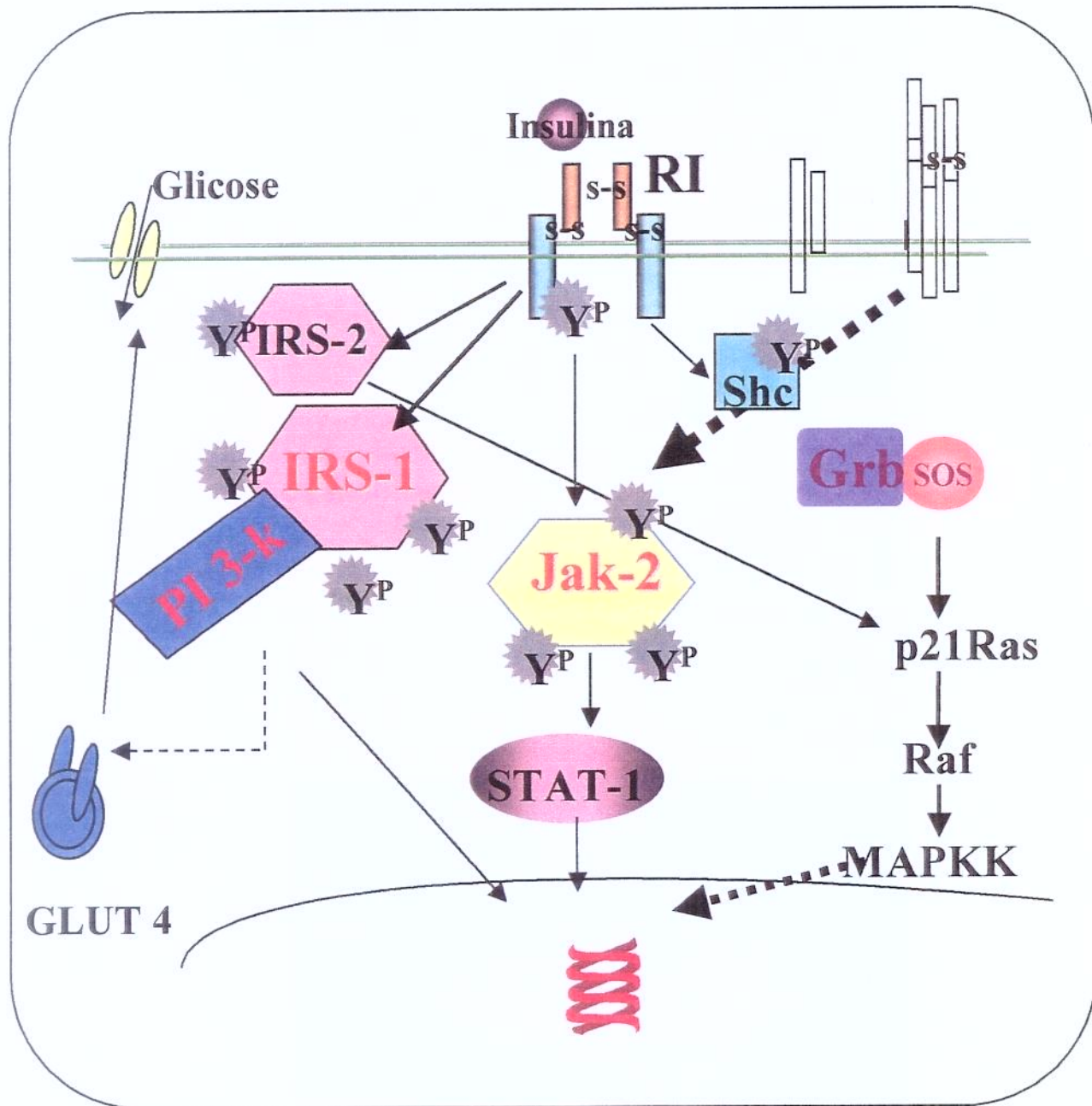
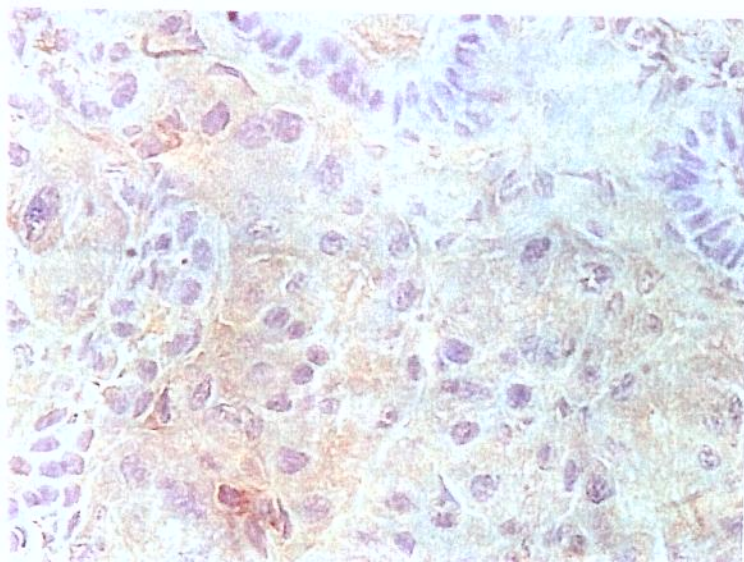
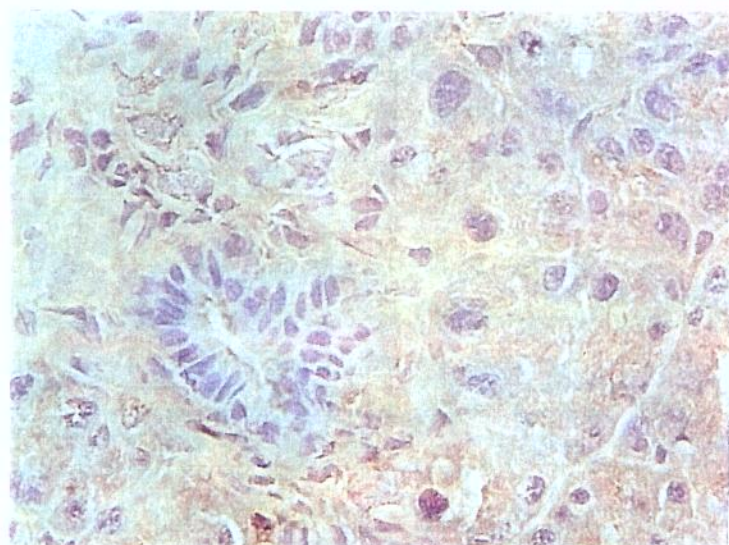


Figura 2. Imunohistoquímica da glândula lacrimal, indicando a presença do receptor de insulina (a) e do receptor de “insulin-like growth factor-I” (b) em citoplasma e membrana plasmática de células epiteliais. Controle negativo (c). (Aumento de 400 vezes).

a.



b.



c.

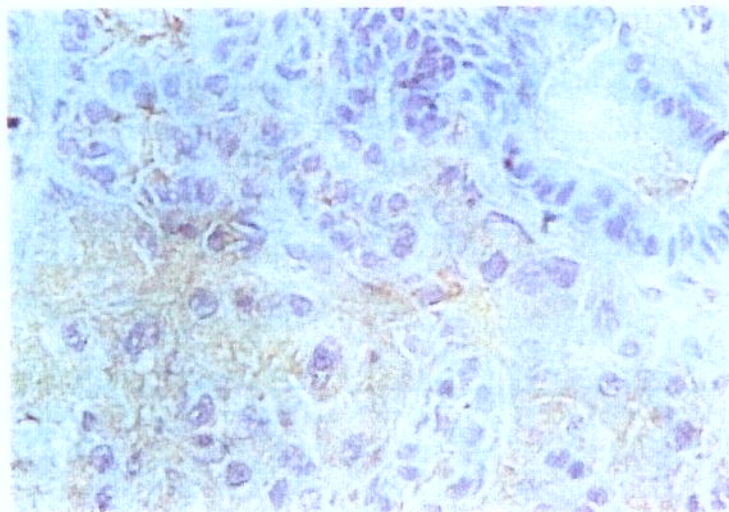
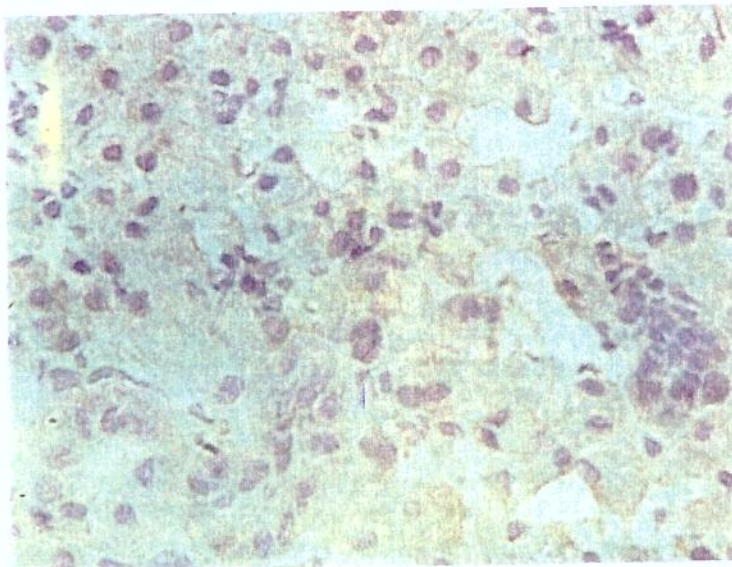
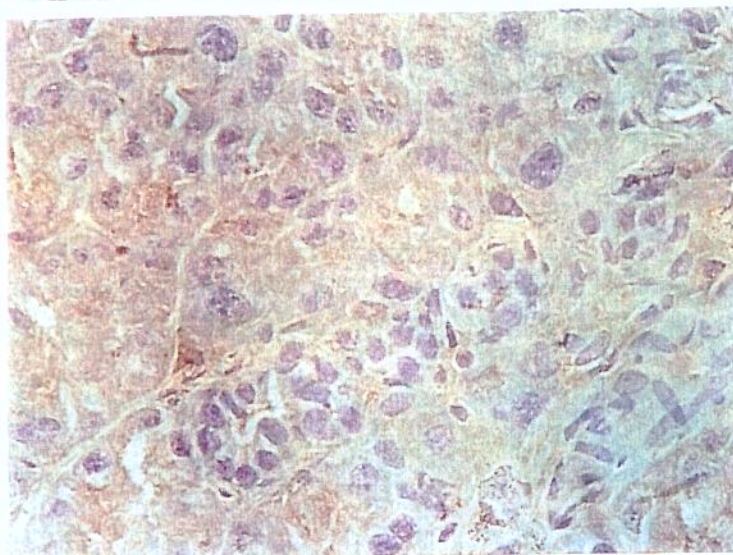


Figura 3. Imunohistoquímica da glândula salivar, indicando a presença do receptor de insulina (a) e do receptor de "insulin-like growth factor-I" (b) em citoplasma e membrana plasmática de células epiteliais. Controle negativo (c). (Aumento de 400 vezes).

a.



b.



c.

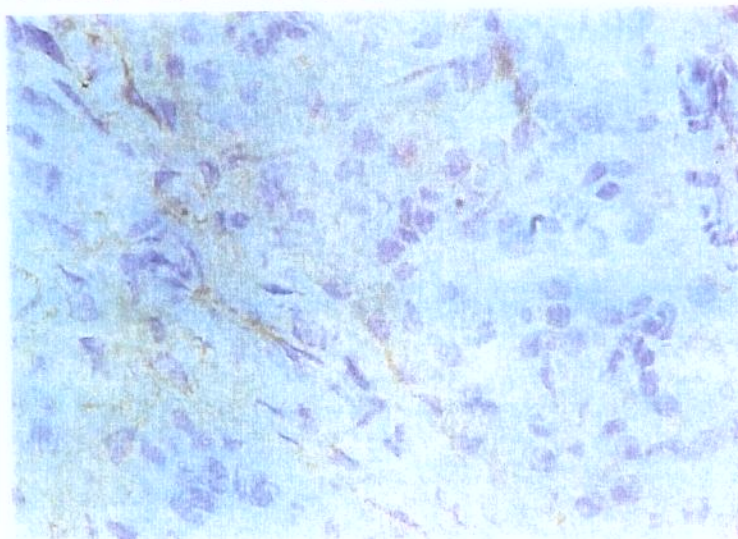


Figura 4. Imunohistoquímica da córnea humana indicando a presença do receptor de insulina (A) e do receptor de "insulin-like growth factor-I" (B) em citoplasma e membrana plasmática de células epiteliais. Controles negativos (C, D). (Aumento de 400 vezes).

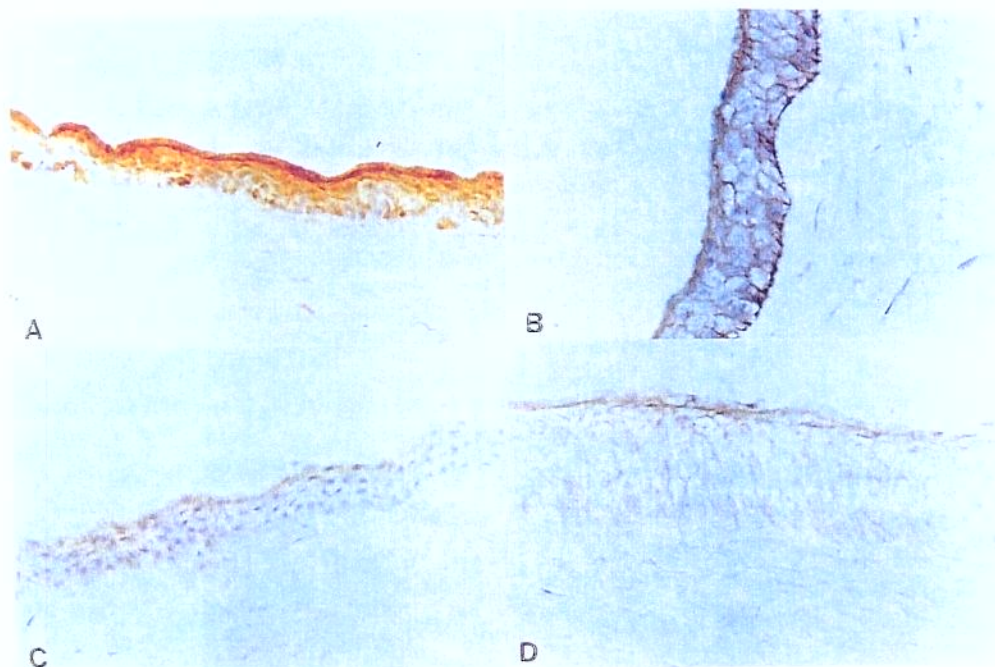


Figura 5. Imunohistoquímica da conjuntiva humana indicando a presença do receptor de insulina (A) e do receptor de "insulin-like growth factor-I" (B) em citoplasma e membrana plasmática de células epiteliais e os controles negativos (C, D). (Aumento de 400 vezes).

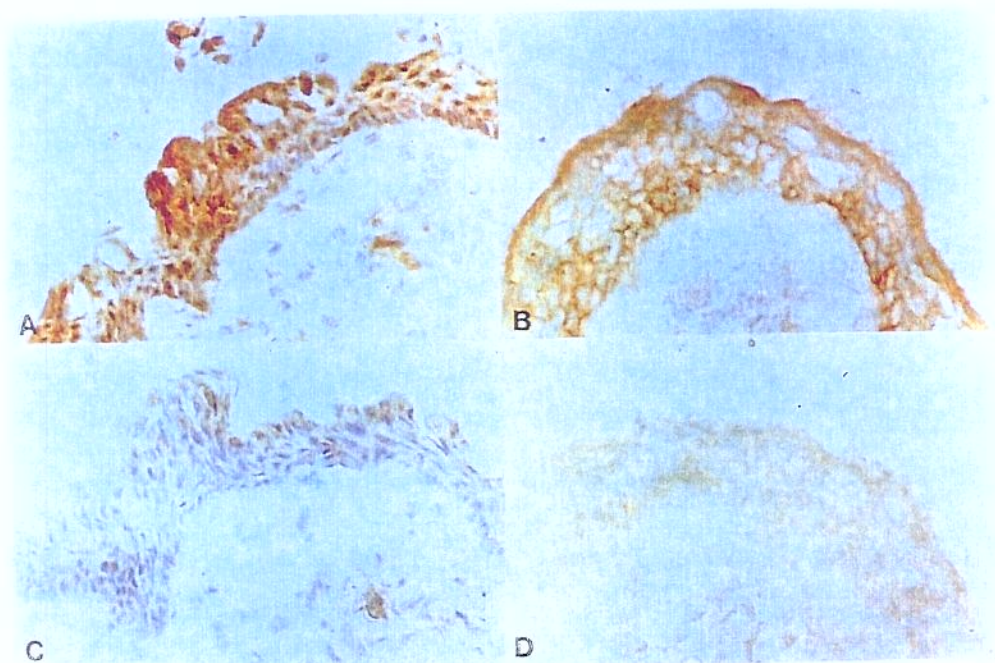


Figura 6. Curva tempo-resposta da fosforilação em tirosina do RI, IGF-IR, IRS-1, IRS-2, Shc, JAK-2 e STAT-1. Glândulas salivares (GS) e lacrimais (GL) de ratos analisadas por imunoprecipitação seguida de “immunoblotting” após a injeção de salina (0) ou insulina (10 μ M).

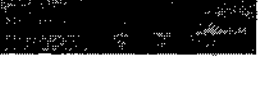
Insulina	GS						GL					
	0	30"	1'	3'	5'	15'	0	30"	1'	3'	5'	15'
RI												
IGF-RI												
IRS-1												
IRS-2												
Shc												
JAK-2												
STAT-1												

Figura 7. Curva dose-resposta da fosforilação em tirosina do RI, IGF-IR, IRS-1, IRS-2, Shc, JAK-2 e STAT-1. Glândulas salivares (GS) e lacrimais (GL) de ratos analisadas por imunoprecipitação seguida de “immunoblotting” após a injeção de salina (0) ou insulina nas doses de 10^{-11} M a 10^{-5} M.

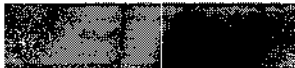
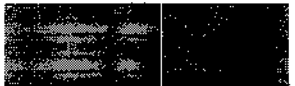
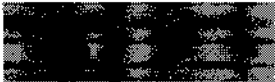
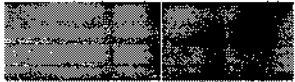
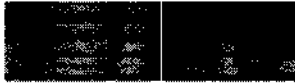
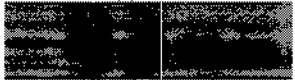
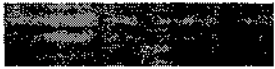
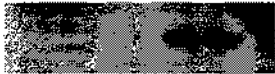
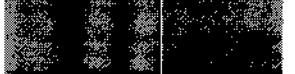
Insulina	GS					GL				
	0	10^{-11}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-5} M	0	10^{-11}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-5} M
RI										
IGF-RI										
IRS-1										
IRS-2										
Shc										
JAK-2										
STAT-1										

Figura 8. Efeito do *diabetes* sobre a fosforilação em tirosina do RI em GL e GS (a,b), do Shc em GL e GS (c,d), e do STAT-1 em GL e GS (e,f). Os valores estão expressos comparando percentuais médios relativos ao controle pós-estímulo com insulina (100%), na forma de média $\pm$ EPM. * $p \leq 0.05$ comparado ao valor do grupo controle.

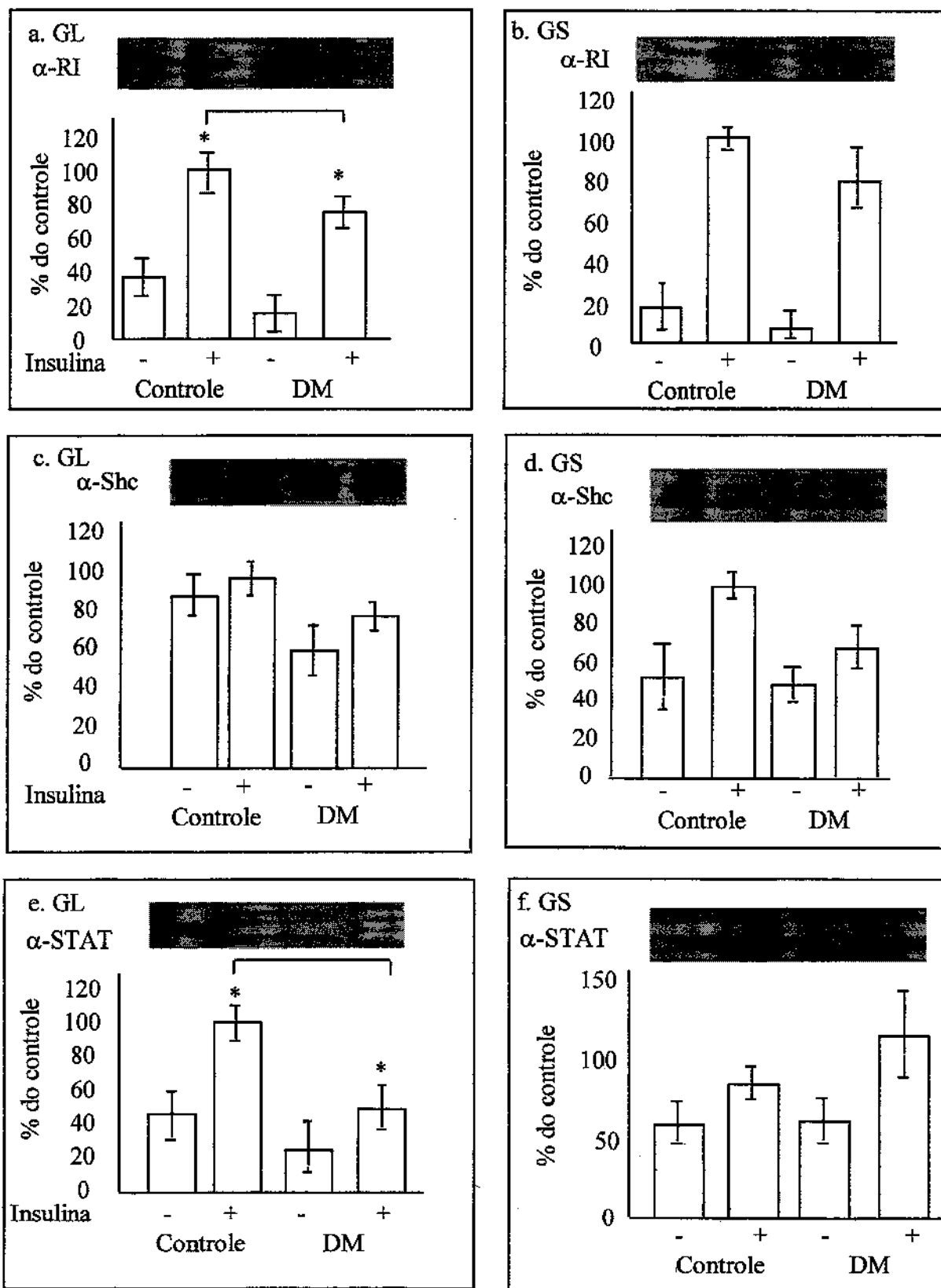


Figura 9. Efeito do envelhecimento sobre a fosforilação em tirosina do RI em GL e GS (a,b), do Shc em GL e GS (c,d), e do STAT-1 em GL e GS (e,f). Os valores estão expressos comparando percentuais médios relativos ao tecido do grupo de 2 meses pós-estímulo com insulina (100%), na forma de média $\pm$ EPM. * p $\leq$ 0.05 comparado ao valor do grupo de 2 meses de idade.

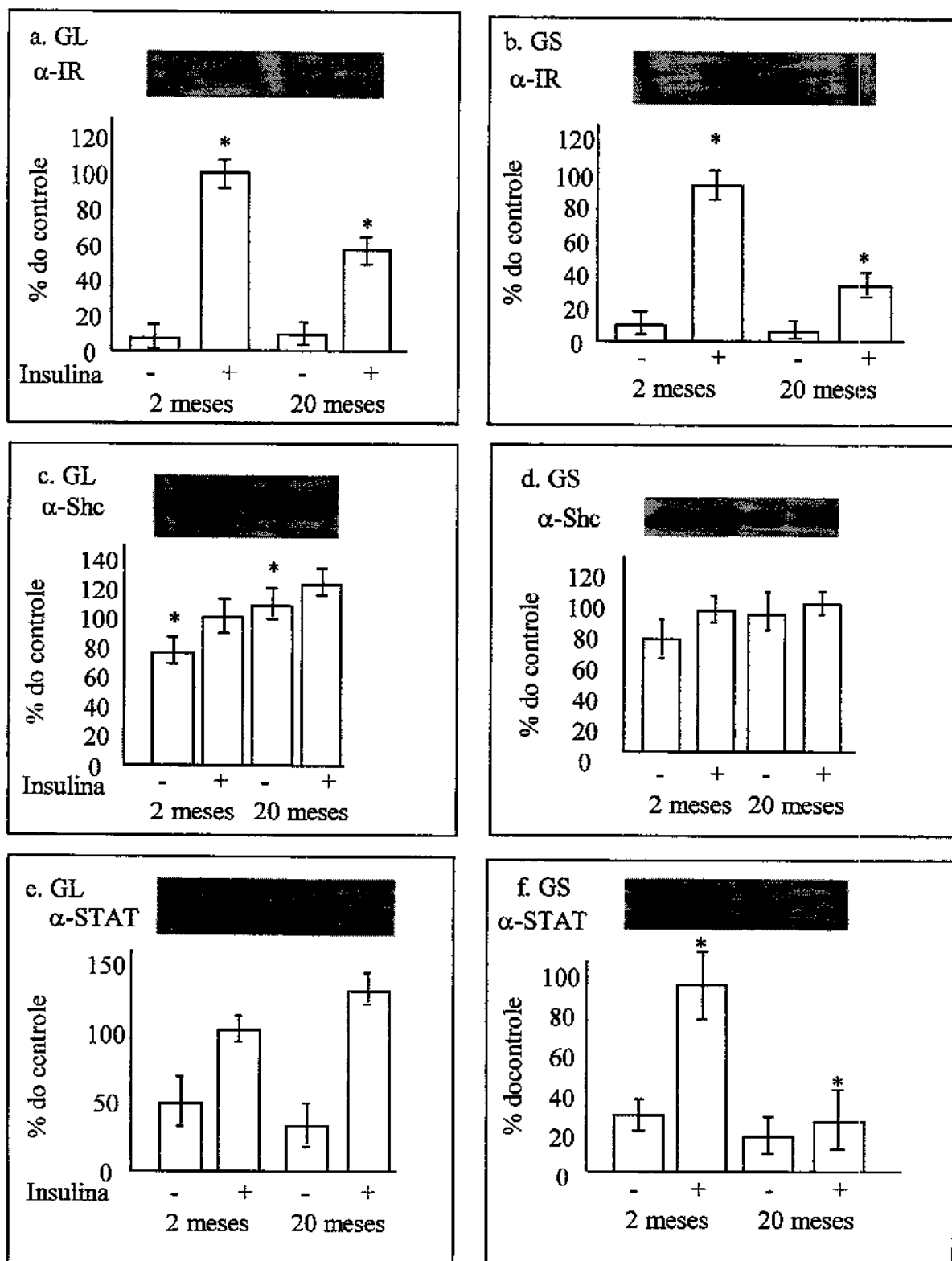


Figura 10. Efeito do gênero sobre a fosforilação em tirosina do RI em GL e GS (a,b), do Shc em GL e GS (c,d), e do STAT-1 em GL e GS (e,f). Os valores estão expressos comparando percentuais médios relativos ao tecido do gênero masculino pós-estímulo com insulina (100%), na forma de média $\pm$ EPM. * $p \leq 0.05$ comparado ao valor do grupo do gênero masculino.

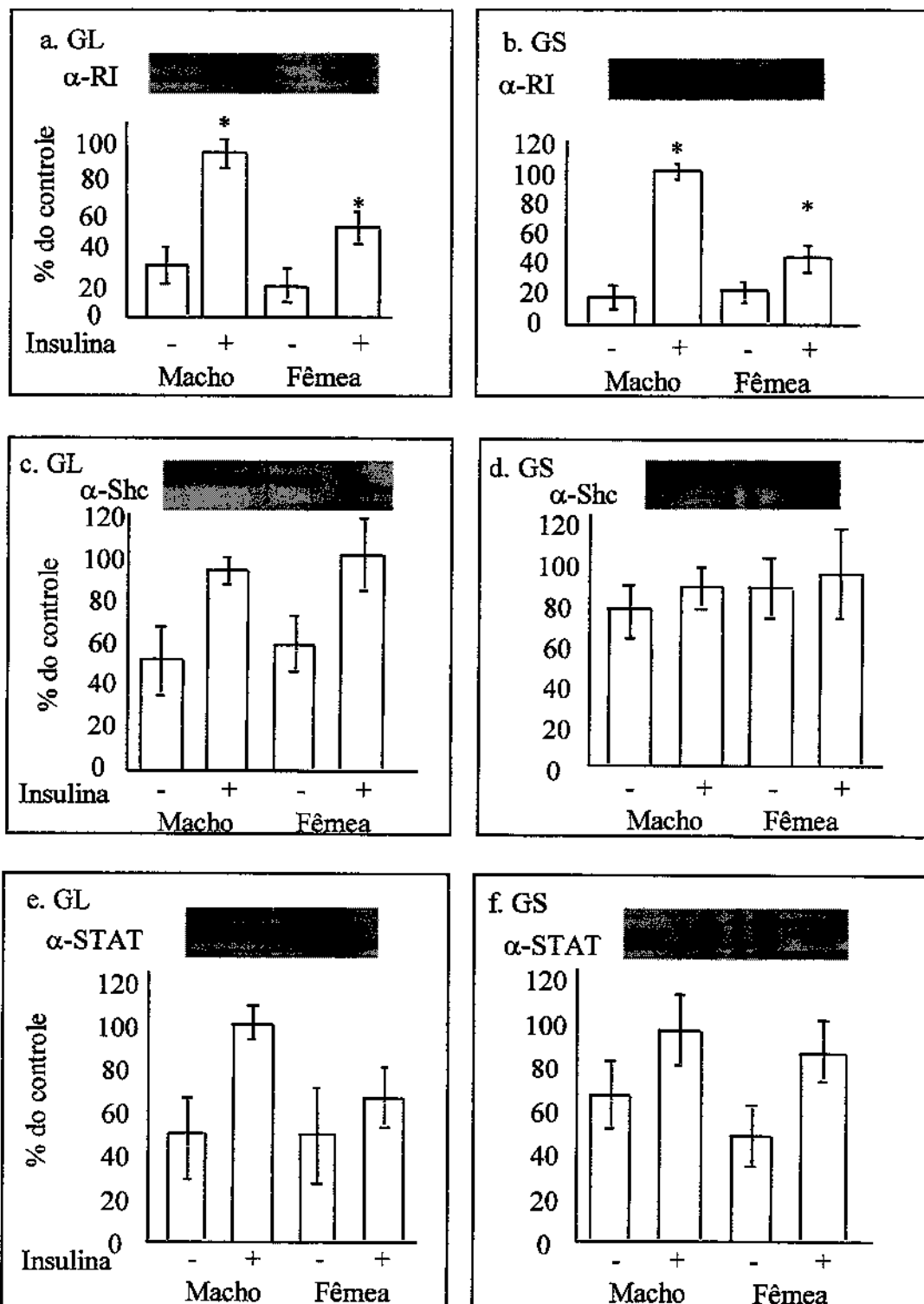


Figura 11. Efeito do ciclo estral sobre a fosforilação em tirosina do RI em GL (A) e GS (B). Os valores estão expressos comparando a porcentagem média relativa ao tecido do grupo na fase estro pós-estímulo com insulina (100%), na forma de média $\pm$ EPM. * $p \leq 0.05$ comparado ao valor do grupo na fase estro.

