

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

LARISSA DOMENEGUETI FERREIRA

Efeito do S-nitroso-N-acetilpenicilamina sobre receptores vaniloide de potencial transitório 1 em córnea de camundongos

Ribeirão Preto
2016

LARISSA DOMENEGUETI FERREIRA

Efeito do S-nitroso-N-acetilpenicilamina sobre receptores vaniloide de potencial transitório 1 em córnea de camundongos

Dissertação apresentada ao Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia Cabeça e Pescoço para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio Vestibular.

Orientador: Prof. Dr. Jayter Silva de Paula

Ribeirão Preto
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Catálogo da Publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Ferreira, Larissa Domenguetti

Efeito do S-nitroso-N-acetilpenicilamina sobre receptores vaniloide de potencial transitório 1 em cornea de camundongos. Ribeirão Preto, 2016.

58 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio Vestibular.

Orientador: Prof. Dr. Jayter Silva de Paula

1. ceratite. 2. hiperalgesia. 3. doadores de óxido nítrico. 4. epitélio da córnea. 5. receptores.

Nome: FERREIRA, Larissa Domenegueti.

Título: Efeito do S-nitroso-N-acetilpenicilamina sobre receptores vaniloide de potencial transitório 1 em córnea de camundongos

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A **Deus**, pela fé que me mantém forte no trabalho e estudo.

Aos meus pais, **Bolívar** e **Maria Helena**, pelo amor, compreensão, apoio, carinho e paciência no dia a dia. E aos meus irmãos pela força e confiança.

Ao meu marido **Rodrigo** pela ajuda e por aguentar meus momentos de ansiedade e nervosismo nesta etapa final.

Agradecimento Especial

Ao meu orientador prof. Dr. **Jayter Silva de Paula** e co-orientador prof. Dr. **Eduardo Melani Rocha** pela dedicação, paciência e todos os ensinamentos a mim passados e principalmente por construir um grande prazer e carinho pela ciência.

Agradecimentos

A toda equipe técnica da casa 19, **Maria de Fátima, Marina Fantucci e Denny Marcos** pela amizade, companheirismo e ensinamentos a mim passados.

A **Carol** e a **Adriana Murashima** pela grande amizade, ajuda na parte prática e teórica neste projeto, paciência e boa vontade em tudo que realizamos. Meu muito obrigada!

A **Carola** e a **Lara** pela amizade e todo o conhecimento dos mais diversos assuntos que me foi passado com paciência e boa vontade.

A **Lilian Esleine**, técnica do laboratório multiusuários pela paciência e boa vontade em seus ensinamentos e explicações.

A equipe do Laboratório do prof. Dr. **Thiago Cunha** pelo apoio técnico.

Ao **Peter Reinach** que mesmo distante colaborou muito para este projeto.

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

Aos funcionários do **Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMRP** **Maria Cecília** por toda sua paciência, orientação e processamento do material.

Aos funcionários da **Cirurgia Experimental da FMRP**, em especial aos técnicos **Danniely N. S. Barros e José Carlos (Carlinhos)** e aos bioteristas **Paulo R. Castilho** e **Ariane M. S. Santana** por sempre me receberem com carinho.

Aos apoios financeiros **CAPES, FAPESP e NAP-FTO** por toda colaboração e serviços prestados a esta pesquisa.

RESUMO

FERREIRA, L.D. **Efeito do S-nitroso-N-acetilpenicelamina sobre receptores vaniloide de potencial transitório 1 em córnea de camundongos.** 2016. 58 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Introdução: Receptores TRPV1 são canais catiônicos nociceptivos não seletivos. Eles desempenham um papel na sensação de dor na córnea. No presente trabalho, descreveremos a resposta do TRPV1 na córnea de camundongos e TRPV1 *-/-* a estímulos químicos e o efeito do SNAP sobre este receptor.

Métodos: camundongos C57BL/6 e TRPV1 *-/-* foram comparados. As observações incluíram o influxo de cálcio na cultura, observação direta e o comportamento de limpeza do olho após o desafio na córnea com 1 μ M da capsaicina (CAP) com ou sem 1mM do colírio SNAP.

Resultados: As características da superfície ocular não eram diferentes entre ambos os genótipos, exceto que a sensibilidade para CAP é inferior em TRPV1 *-/-* ($p = 0,0019$ e $0,0095$, respectivamente). A imunocoloração revelou que TRPV1 é expresso na camada basal do epitélio da córnea, apenas nos camundongos C57BL/6. CAP estimula o influxo de cálcio em cultura de células epiteliais e a sensibilidade corneana em C57BL/6 *in vivo* foi reduzida na presença do SNAP ($p = 0,0329$ e $0,01$, respectivamente).

Conclusão: A ausência dos receptores TRPV1 no epitélio da córnea não afeta o fenótipo da superfície ocular de camundongos. A resposta para tirar colírios revelou que ela poderia funcionar como uma terapia analgésica devido ao seu antagonismo com o TRPV1.

Palavras-chave: córnea, camundongo, receptor potencial transitório vaniloide, TRPV1, SNAP

ABSTRACT

FERREIRA, L.D. **Effect of S-nitroso-N-acetylpenicillamine on transient receptors potencial vanilloid type 1 in córnea of mice.** 2016. 58 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

TRPV-1 receptors are non-selective nociceptive cation channels. They play a role in cornea sensation. In the present work we describe the response of corneas of TRPV1^{-/-} and mice to chemical stimuli and the effect of SNAP on this receptor. TRPV1^{-/-} and C57BL/6 mice were compared. The observations included the calcium influx in culture, direct observation and the behavior of eye wipe after corneal challenge with 1 μ M Capsaicin (CAP) with or not 1mM SNAP eye drops. Ocular surface characteristics were not different between both genotypes, except that the sensitivity to CAP is lower in TRPV1^{-/-} (p=0.0019 and 0.0095, respectively). Immunostaining revealed that TRPV 1 is expressed in the basal layer of the cornea epithelia, only in the C57 mice. CAP stimulated calcium influx in epithelial cells in culture and cornea sensitivity in C57 mice *in vivo* was reduced in the presence of SNAP (p=0.0329 and 0.01, respectively). The absence of TRPV-1 receptors in the cornea epithelia did not affect the ocular surface phenotype in mice. The response to SNAP eye drops revealed that it could work as an analgesic therapy due to its antagonism to the TRPV1.

Key words: cornea, mouse, transient receptor potential vanilloid, TRPV-1, SNAP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Camadas da córnea	17
Figura 2 -	Representação dos tipos de fibras nervosas	20
Figura 3 -	Representação esquemática do receptor TRPV1	23
Figura 4 -	Representação esquemática da formação de NO	27
Figura 5 -	Microfotografia de uma cultura de células epiteliais da córnea de camundongos	34
Figura 6 -	Fotomicrografias das córneas demonstrando a expressão do receptor TRPV1	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Influxo de cálcio realizado em cultura celular do epitélio da cónea	38
Gráfico 2 -	Comparação dos valores de viabilidade celular	39
Gráfico 3 -	Distribuição do número de movimento pata ao olho	41

LISTA DE ABREVIÇÃO

ATP	Trifosfato de Adenosina
Ca ²⁺	Cálcio
CAP	Capsaicina
CaM	Calmodulina
Céls	Células
sCG	Guanilil Ciclase solúvel
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene Calcitonina
CN	Calcineurina Neuronal
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	Matriz Extracelular
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GSNO	S-Nitrosoglutationa
HSV	Vírus do Herpes Simplex
NADPH	Fosfato dinucleótido adenina nicotinamida
NGF	Fator de Crescimento de Nervo
NO	Óxido Nítrico
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
PKA	Proteína Quinase A
PKC	Proteína Quinase C
PtdIns/PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
RTX	Resiniferatoxina

SNC	Sistema Nervoso Central
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
TRP	Receptor de Potencial Transitório
TRPV	Receptor Vaniloide de Potencial Transitório
TRPV1	Receptor Potencial Transitório Vaniloide 1
UV	Ultravioleta
USP	Universidade de São Paulo
VR1	Receptor Vaniloide 1
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1.	<i>Córnea</i>	16
1.2.	<i>Ceratite</i>	18
1.3.	<i>Dor e Hiperalgisia</i>	19
1.4.	<i>Receptor Potencial Transitório Vaniloide 1</i>	21
1.5.	<i>Óxido Nítrico</i>	26
2.	OBJETIVOS	30
2.1.	<i>Objetivos específicos</i>	31
3.	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1.	<i>Modelo animal</i>	33
3.2.	<i>Cultura de células epiteliais da córnea</i>	33
3.3.	<i>Tratamento com SNAP</i>	34
3.4.	<i>Viabilidade celular</i>	34
3.5.	<i>Medidas do Influxo de cálcio</i>	35
3.6.	<i>Imunofluorescência</i>	35
3.7.	<i>Avaliação comportamental de dor ocular</i>	36
3.8.	<i>Análises estatísticas</i>	36
4.	RESULTADOS	37
4.1.	<i>Ação do SNAP e CAP em cultura de células epiteliais</i>	38
4.2.	<i>Viabilidade da cultura de células epiteliais após tratamento</i>	39
4.3.	<i>Expressão corneana do TRPV1</i>	39
4.4.	<i>Avaliação comportamental de dor ocular</i>	40
5.	DISCUSSÃO	42
6.	CONCLUSÃO	45
6.1.	<i>Conclusões específicas</i>	46

7.	REFERÊNCIAS	47
8.	ANEXOS	58

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os receptores vaniloides de potencial transitório (TRPV) são sensíveis a mudanças no ambiente e ao transformar agressões do ambiente em sensação de dor, ajudam na sinalização para proteção e restauração da córnea frente a essas agressões. O S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), um doador de óxido nítrico, pode atuar na modulação desse sinal e ter papel terapêutico em muitas condições clínicas, nas quais se observa um processo inflamatório associado à lesão da córnea.

1.1. Córnea

A córnea humana é uma estrutura complexa e consiste em 5 camadas, a saber: epitélio, cápsula de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio. (1,2) A forma e curvatura se dão pela estrutura biomecânica intrínseca e extrínseca, a rigidez, elasticidade e assim criam um sistema óptico esférico.

A superfície epitelial é a primeira barreira da cornea em relação ao ambiente externo e é constituída por uma camada escamosa estratificada, não queratinizada e uniforme de limbo a limbo, (3) com 4 a 6 camadas de células de espessura. As células epiteliais possuem uma meia vida de 7 a 10 dias e envolvem por apoptose (morte celular programada), resultando em descamação com renovação completa da camada celular a cada semana, por meio da substituição das camadas mais superficiais pelas mais profundas. (3) A camada celular mais profunda do epitélio da córnea é a camada basal, única capaz de fazer mitose (4) e, quando danificada, inicia o processo de cicatrização, quando a membrana basal fica notadamente instável e fraca. (3)

A cápsula de Bowman é uma camada acelular que encontra-se anterior ao estroma da córnea, a partir de fibras de colágeno, que ajuda a manter o formato da córnea. (1,2)

O estroma é a maior parte da estrutura da córnea compreendendo 80 a 85% de sua espessura. Ela difere das outras estruturas de colágeno pela sua transparência, como resultado da organização das fibras do estroma e matriz extracelular (ECM). (5,6) As fibras de colágeno do estroma são organizadas em feixes paralelos chamadas fibrilas que reduzem a dispersão de luz e contribuem para a transparência e resistência mecânica da córnea. (3)

A membrana de Descemet separa e mantém o formato da estrutura da córnea. E ela é a segregação da continuação das células endoteliais, uma membrana basal modificada, que antes do nascimento adquire 3 μ m e pode acumular até 10 μ m de espessura com a idade. (1,2)

E a camada endotelial da córnea, que é uma monocamada de células poligonais, formato de mosaico, que mantêm a clareza e garante a deturgescencia estromal. (3) A deturgescencia da córnea é a desidratação do estroma mediada pelo processo da bomba de sódio e potássio, deixando-o relativamente hiposmótico para o humor aquoso. (7) Os seres humanos nascem com uma reserva de células endoteliais que diminui gradualmente ao longo da vida por processos, como a idade, traumatismos, inflamação e processos de doenças, porém as células vizinhas aumentam para assumirem o espaço das células que não se regeneraram. (1,2)

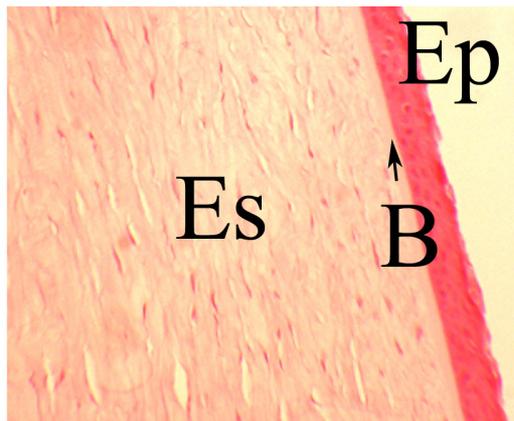


Figura 1. Camadas da córnea (adaptada de Bicas e Homs; Oftalmologia: fundamentos e aplicações).

Além de sua estrutura biomecânica e suas camadas, a córnea é caracterizada por ser o tecido do corpo humano mais innervado e sensível. Os nervos da córnea são derivados do ramo nasociliar da primeira divisão do nervo trigêmeo (divisão oftálmica). (8) Estas fibras nervosas dividem-se em numerosos ramos menores, constituindo uma rede de nervos delicados. Abaixo da membrana basal do epitélio, as fibras A-delta encontra-se em linha reta paralela à superfície da córnea e as fibras C não mielinizadas passam por uma

curta distância naquela região e terminam perpendicularmente logo abaixo da superfície epitelial na forma de terminações nervosas livres. (9)

Ainda, estas fibras nociceptivas respondem coletivamente a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. (10) Aproximadamente 20% dos nociceptores da córnea são mecanorreceptores A-delta que geram dor aguda, 70% são polimodais e 10% são fibras C receptores de frio. Além disso, a localização anatômica e tipo de fibras nervosas da córnea podem ser classificados com base nos seus perfis neuroquímicos, como por exemplo, a substância P liberada diretamente a partir das fibras C em situações inflamatórias. (10,11)

1.2. Ceratite

Ceratite é o termo utilizado para conceituar afecção da córnea, seja inflamatória, infecciosa, traumática, geralmente acompanhada por dor ocular. A intensidade da dor pode variar, mas diversos pacientes se queixam ainda de fotofobia, sensação de corpo estranho e lacrimejamento. (12)

Existem várias causas que levam a ceratite: desde infecções virais, bacterianas, fúngicas, por protozoários, processos autoimunes e traumas corneanos. Isso pode progredir para um quadro de leucoma, uma opacidade na córnea, e quando não tratadas podem ocasionar complicações como úlcera de córnea, perfuração e cicatrizes, acompanhadas ou não por uveítes, glaucoma e perda visual parcial ou total. (13)

Atualmente, a causa mais comum de ceratite infecciosa é a ceratite bacteriana em usuários de lentes de contato, principalmente pelo agente *P. aeruginosa*, (14) mas também pode ser causada por infecções polimicrobianas. (2) Essa é uma das principais causas de cegueira nos países desenvolvidos. (15)

Na ceratite viral, o agente mais comum é o vírus do Herpes Simplex (HSV) (12) observado como uma das causas mais comuns de cegueira relacionada à córnea no mundo, e na infância a maior parte dos casos é assintomático. (13) Já a ceratite fúngica é mais comum em regiões que apresentam clima tropical, possuem como principais agentes o *Fusarium* e *Aspergillus* frequentemente transmitidos por lesões causadas por materiais vegetais. (16) Atualmente, também pode ser observado a ocorrência de ceratite por exposição aos raios ultra-violeta (UV) pela exposição ao sol, de profissionais soldadores ou

que convivam com lâmpadas UV germicidas, (17) apresentando dor intensa a partir de 6 a 12 horas após a exposição a essas fontes UV. (12)

Independente do agente da ceratite ser infecciosa ou não, os principais sintomas são BAV, fotofobia, a dor intensa e a sensação de corpo estranho. (12) E essa resposta nervosa será determinada pelo tipo de ceratite e pela localização nas camadas internas da córnea e seus nervos. (10) Além disso, os nociceptores corneanos liberam vários tipos de peptídeos e neurotransmissores, por estímulos nocivos, facilitando o início do processo inflamatório. (14)

Os tratamentos para os vários tipos de ceratite são variados e incluem antibióticos, antiinflamatórios tópicos e sistêmicos e analgésicos orais. (12) Porém deve-se tomar cuidado com a utilização excessiva de corticoides tópicos, pela frequência de efeitos colaterais como toxicidade epitelial e glaucoma. (10)

1.3. Dor e Hiperalgisia

Nocicepção é o processo pelo qual estímulos agressivos térmicos, mecânicos ou químicos são detectados por subpopulações de fibras nervosas periféricas chamadas nociceptores, levando à percepção de dor pelo indivíduo. Os corpos celulares dos nociceptores corneanos estão localizados nos gânglios trigeminais e são ativados por estímulos nocivos, respondendo seletivamente a alterações biofísicas e moleculares locais. (18) Os nociceptores são separados em duas principais classes: fibras de diâmetro médio, mielinizados, aferentes e que medeiam a dor aguda ou dor rápida (fibras A-delta); e fibras de diâmetro pequeno, não mielinizados e que medeiam a dor crônica ou lenta (fibras C), conhecidas por serem polimodais, isto é, sensíveis a diferentes estímulos nocivos. (18)

Calibre dos axônios

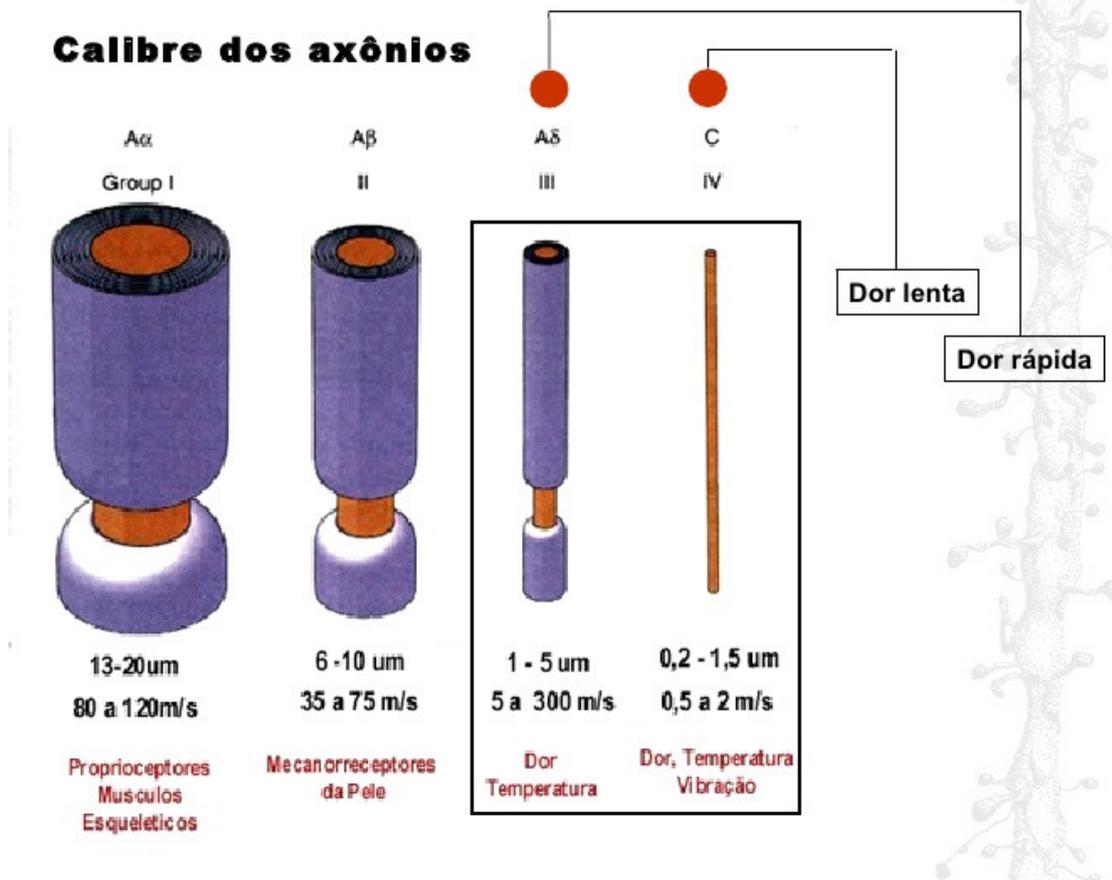


Figura 2. Representação dos tipos de fibras nervosas. As fibras nervosas A δ estão envolvidas na percepção da dor rápida (nociceptores). E as fibras nervosas C estão envolvidas na percepção da dor lenta (nociceptores). Elas podem ser ativadas por processos térmicos, químicos e mecânicos que resultam em dor, além de componentes, como os encontrados no processo inflamatório. (pt.slideshare.net/Cpericles/neuropathic-pain-summary-portuguese)

Alguns componentes que se encontram no processo inflamatório, como prótons, ATP, serotonina ou lipídios específicos podem alterar a excitabilidade neuronal diretamente por interação com canais iônicos da superfície do nociceptor, enquanto que outros, como por exemplo a bradicinina e o Fator de Crescimento do Nervo (NGF) se ligam a receptores metabotrópicos, ou seja, receptores que desencadeiam as reações inflamatórias através de segundos mensageiros para interação com os canais iônicos chamado de cascata de sinalização. (20) Um exemplo disso é a bradicinina que ativa receptores acoplado a proteína G para estimular fosfolipase C hidrólise catalisada do Fosfatidilinositol 4,5-

bifosfato (PtdIns ou PIP2) (21,22) e conseqüentemente, liberado Ca^{2+} a partir de armazenamentos intracelulares e ativação da Proteína Quinase C (PKC). (23)

A sensibilização da córnea aos estímulos nocivos, em parte, é determinada pelos limites de ativação de transdutores nociceptivos. O maior grupo conhecido compreende a família dos Receptores de canais de Potencial Transitório (TRP) (24,25) que são sensibilizados por citocinas pró-inflamatórias liberadas durante a inflamação. (26)

Os nociceptores envolvidos na dor periférica desencadeiam a liberação de mediadores inflamatórios, como NGF, que além de sensibilizar os nociceptores, (27,28) são conhecidos por aumentar a expressão e ativação de transdutores pelo Receptor de canal de cations de Potencial Transitório da subfamília Vaniloide (TRPV), que dependendo de sua sinalização desencadeará a dor neuropática ou química. (26)

Hiperalgisia é a resposta dolorosa desproporcionalmente aumentada para uma determinada estimulação sofrida pelo tecido. Rotineiramente ocorre em dores neuropáticas, mas também pode fazer parte de qualquer tipo e condição de dor crônica, desde uma simples dor local ou sensibilização dos nociceptores C ou A-delta. (19)

1.4. Receptor Vaniloide de Potencial Transitório 1 (TRPV1)

O TRPV1 é altamente expresso nos neurônios sensoriais periféricos que retransmitem estímulos nocivos térmicos e químicos. A ativação de TRPV1 nestes neurônios provoca uma despolarização rápida e de potenciais de ação para a medula espinhal. No entanto, a ativação do receptor leva à constante dessensibilização e reduz a atividade elétrica dos nervos sensoriais. A perda aguda da atividade neuronal é provavelmente devido à inativação dos canais de sódio dependentes de voltagem onde ocorre potenciais de membrana positivos, enquanto que a inibição de longa duração da atividade é provavelmente devida ao aumento concomitante do Ca^{2+} intracelular, que faz com que ocorra a longo prazo alterações morfológicas e funcionais nos terminais nervosos. (56) A modulação de TRPV1 é sensibilizada por meio do acoplamento com o o segundo mensageiro que vem da cascata de sinalização por uma variedade de agentes pró-inflamatórios e pró-analgésicos incluindo o NGF, bradicinina, lipídeos, prostaglandinas e ATP. (35,59) Além disso, a atividade de TRPV1 contribui para a inflamação neurogênica em que nociceptores liberam mediadores inflamatórios, atuando, assim, de forma

autônoma em células para promover a inflamação e hiperalgesia. (60) A análise de camundongos Knockout mostrou que o TRPV1 é necessário para o desenvolvimento de hiperalgesia térmica inflamatória, demonstrando um papel essencial para o TRPV1 na hipersensibilidade dolorosa associada com doenças que causam dor crônica. (61,62)

A maior parte dos nociceptores polimodais possuem a capacidade de reconhecer a sensação de dor resultante do calor, frio ou pressão descodificando sinais nociceptivos dentro do Sistema Nervoso Central (SNC). (14) Canais iônicos dependentes de voltagem e os componentes do TRP da família de canais iônicos estão associados com a transdução de sensação de frio e dor relacionada ao frio. (29,30)

Os receptores sensoriais se encontram nos terminais aferentes primários, que inervam a derme da pele, epiderme e epitélios viscerais. Esses receptores detectam alterações ambientais externas e internas, tais como temperatura, fatores mecânicos, químicos exógenos ou endógenos. Essas alterações, quando extremas a ponto de danificarem o tecido, são detectadas pelos receptores sensoriais fibras C e fibras A-delta conhecidos como fibras de dor e pelo seu principal receptor, o TRPV1. (31,32) O receptor TRP ativa essas fibras através de sinais elétricos ou despolarização devido ao influxo catiônico, (33) além da detecção direta de elementos físicos ou químicos nocivos, eles participam da transdução do sinal inflamatório.

O canal TRPV1 é conhecido também como canal de capsaicina (CAP), substância pungente encontrada na pimenta vermelha. Além da CAP, temperaturas elevadas (>42°C), hiperosmolaridade, pH ácido, produtos químicos irritantes e poliaminas lipidérgicas (34,35) podem estimular o TRPV1, mostrando sua capacidade de detecção polimodal e sensibilidade a estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos. (33) A CAP é uma molécula hidrofóbica que tem semelhança estrutural com vários segundos mensageiros lipídicos. (14) Definições fisiológicas mostram que estas moléculas podem atuar como agonistas de Receptor Vaniloide 1 (VR1) envolvidos na inflamação. Assim, a principal questão é se eles atuam sinergicamente com outros agentes pró-inflamatórios, tais como a bradicinina, o NGF ou prótons, para facilitar a passagem pelo VR1 e promover hipersensibilidade térmica em locais de lesão tecidual. (14) A expressão de TRPV1 é observada nos nociceptores C e A-delta, receptores polimodais, que respondem a um grande número de sinais prejudiciais ao tecido. (33) Mediadores da dor inflamatória,

incluindo o NGF, bradicinina e prostaglandinas, através das suas ligações ao receptor acoplado a proteína G ou ao receptor-tropomiosina-quinase, desencadeiam cascatas enzimáticas que aumentam tanto a atividade quanto a expressão de TRPV1, resultando num aumento de fibras C de excitação e sensibilização. (23)

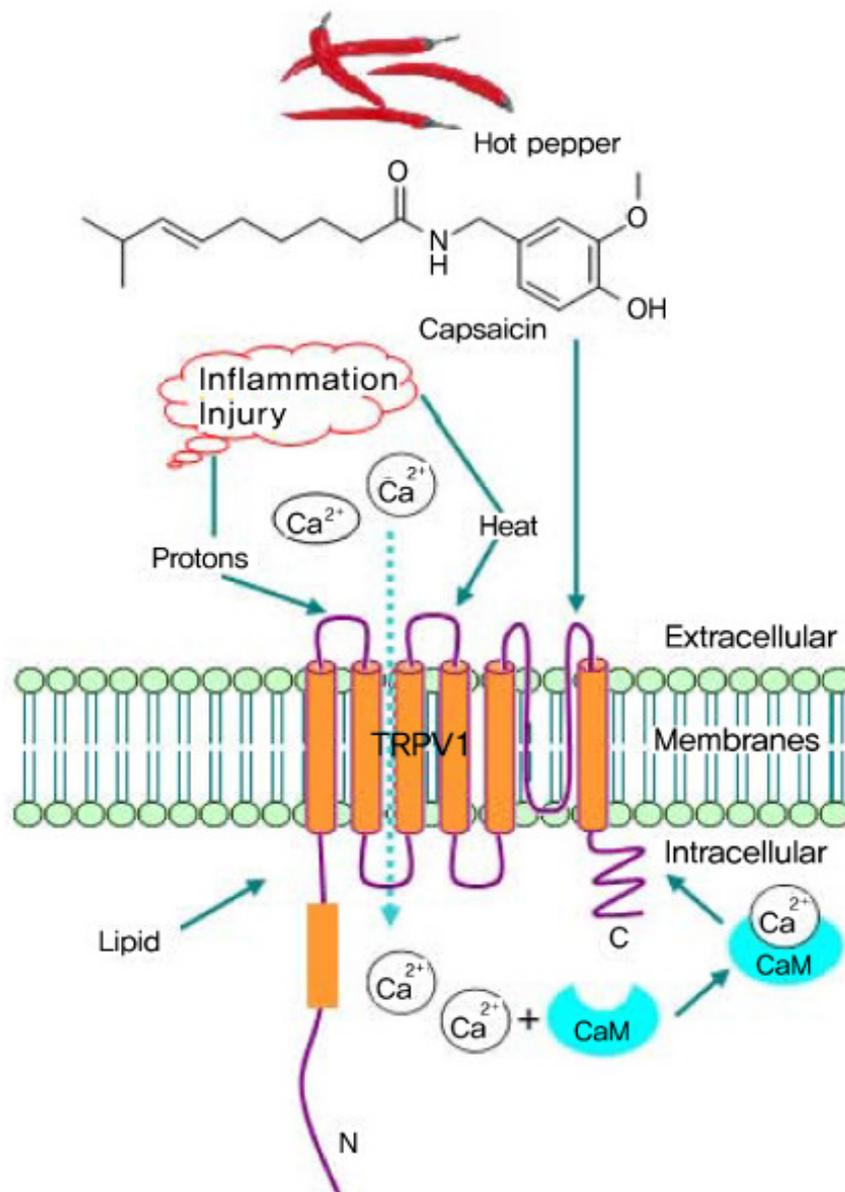


Figura 3. Representação esquemática do receptor TRPV1 (receptor de capsaicina). O TRPV1 modula a entrada de Ca^{2+} . É um canal iônico e um receptor polimodal para vários processos como, por exemplo, o inflamatório. (synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5646/jksh.2011.17.2.37&vmode=PUBREADER#lpo=11.9048)

Um subconjunto de fibras C contém Peptídeo Relacionado ao Gene Calcitonina (CGRP) e substância P nos seus terminais, que são liberados quando excitados por processo inflamatório periférico e central. Na periferia, os tecidos inflamados e células imunes infiltradas podem tornar-se cada vez mais estimulados por estes peptídeos e, como resultado, sinais para liberar mais substâncias pró-inflamatórias. Além disso, tais peptídeos também podem estimular de forma auto-limitada as fibras C. (36,37) No tocante às sinapses centrais, a liberação de neuropeptídios contribui para a formação de um estado de plasticidade sináptica hiperalgésica, o que dá origem a dor crônica. Assim, a modulação de TRPV1, associada ao controle da estimulação das fibras C, parece ser um passo inicial importante para controlar estados inflamatórios de dor. (33)

Os primeiros trabalhos que caracterizaram a liberação de neuropeptídios da medula espinal de rato após infusão intratecal de CAP sugeriram que a ativação do receptor TRPV1 foi regulada, pelo menos em parte, pelo TRPV1, dependente de fosforilação da proteína traduzida. (38) Um estudo de Dochertv e colaboradores mostrou que a fosfatase da Calcineurina neuronal (CN) desempenha um papel importante na desfosforilação do TRPV1, se mostrando responsável por diminuir as atividades dos canais dependentes, na presença de Ca^{2+} extracelular. (39)

A CAP provoca sensação de dor (queimação) por ativar seletivamente neurônios sensoriais que transmitem informações sobre estímulos nocivos ao SNC. (40) O receptor de CAP, TRPV1, pode ser ativado por CAP e também calor ($>43^{\circ}C$), lipídeos ácidos, etc (41) Esta sensibilidade polimodal de TRPV1 levanta questões óbvias sobre os mecanismos estruturais pelos quais estímulos químicos e físicos regulam a atividade deste canal. (42) Análogos de CAP como a resiniferatoxina (RTX) são lipofílicos, sendo possível a passagem através da membrana celular, podendo atuar nos sítios de ligação que se encontra na superfície intracelular de TRPV1. (43)

Existem várias diferenças nas propriedades do TRPV1, incluindo a proporção de permeabilidade catiônica e de Ca^{2+} independente de dessensibilização, sugerindo que as respostas mediadas por TRPV1 à CAP envolvem diferentes mecanismos. O fato de que certas mutações e a fosforilação de Proteínas Quinase A (PKA) ou PKC conduzem à redução da temperatura do limiar para ativação de TRPV1 (44–46) sugere efeitos mais térmicos mais globais sobre o TRPV1. (42)

A CAP não só provoca dor, mas também parece exibir propriedades analgésicas. (40) A dessensibilização à CAP é um processo complexo com vários componentes cinéticos, como, por exemplo, um componente rápido que parece depender de influxo de Ca^{2+} através de TRPV1. (38,39,47,48)

Também foi relatado o envolvimento de Calmodulina (CaM) na dessensibilização dependente de Ca^{2+} do TRPV1, (49) o qual se ligaria a um segmento de 35 aminoácidos no terminal C do TRPV1. A ruptura dessa ligação impede que ocorra no Ca^{2+} extracelular dessensibilização dependente TRPV1 para informar a aplicação de CAP, embora algumas dessensibilizações ainda é observado após a aplicação de CAP mais prolongada nas células que expressam o mutante. Dessensibilização do receptor dependente de Ca^{2+} é uma característica relativamente comum de muitos canais de cátions, incluindo canais TRP. (50,51) Isso pode representar um mecanismo de segurança fisiológica contra uma sobrecarga de Ca^{2+} prejudicial a célula, especialmente durante o grande influxo de Ca^{2+} através dos canais. Deve-se notar que formas de dessensibilização de TRPV1 independentes de Ca^{2+} também existe. Estes incluem a dessensibilização produzida por exposição contínua ou repetida ao calor que é observada mesmo na ausência de Ca^{2+} . (52)

Muitos estudos sobre o TRPV1 em condições de dor têm mostrado sua ligação com processos de dor inflamatória. Um estudo em seres humanos revelou um aumento do número de fibras imunorreativas TRPV1 em condições de hiperalgesia inflamatória da pele. (53) O TRPV1 é considerado um novo alvo no estudo do tratamento da dor crônica. Há mais de dez anos, foi observado que altas doses de CAP aplicadas topicamente ou sistematicamente em animais de experimentação provocaram analgesia. (54,55) Este estudo mostra que estudos futuros é necessário para definir os papéis do “receptor de CAP” e o componente neurogênico sensíveis à CAP da resposta inflamatória, funções efetoras sensoriais periféricas e criação de novos alvos para terapêuticas anti-nociceptivas e anti-inflamatórias. (56)

Camundongos “knockout” para o TRPV1, gerados nos últimos anos, têm sido extensivamente estudados para se determinar o papel deste receptor na sinalização fisiológica normal e em processos patológicos. (57,58) Tomados em conjunto, *in vitro* e *in vivo* evidência experimental implica fortemente que o TRPV1 é um importante receptor polimodal cuja função é a de combinar vários estímulos físicos e químicos nocivos em uma

única resposta nociceptiva predominantemente durante as condições inflamatórias e danos nos tecidos. (56)

Mediadores inflamatórios a partir do meio externo encontrados em condições de doença podem sensibilizar indiretamente o receptor TRPV1, como: a bradicinina, ATP extracelular, glutamato, prostaglandinas e NGF, que se encontram acoplados a proteína G e das vias da cinase de tirosina. Portanto, a multidão de ativadores primários e secundários de moduladores no processo inflamatório que integre com TRPV1 sugere fortemente que ele é um importante ponto de convergência de vários estímulos de dor produzido. A maioria dos nociceptores que expressam TRPV1 contém o neuropeptídeo inflamatório CGRP e a substância P.

1.5. Óxido Nítrico (NO)

O Óxido Nítrico (NO) desempenha um papel importante na fase inflamatória aguda (63) e estados de dor crônica (64) ao nível central (65) e periférico. (66) (67). Ele é um radical livre sintetizado por várias células e tecidos, e nos mamíferos foram identificadas três diferentes enzimas que sintetizam NO: a Óxido Nítrico Sintase Neural (nNOS), Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS) e Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS). No SNC, o NO está concentrado no corno dorsal da medula espinhal, em que ele é derivado a partir de diversas fontes (incluindo as células gliais). A nNOS em papel é circuitos da medula espinhal. Além nNOS, os eNOS também são encontrados em algumas populações neuronais e vasos sanguíneos. (65,68). No que diz respeito à iNOS, existe alguma divergência se esta isoforma também participa na transmissão central da dor ou é expressa apenas periféricamente durante os processos de dor inflamatória ou neuropática. (65).

O processo de síntese de NO inclui diferentes substratos (L-arginina e oxigênio molecular e NADPH como espécie redutora) e produtos finais, o NO e a L-citrulina. As enzimas eNOS e nNOS são ativadas pelo aumento de Ca^{2+} , mas o NO requer também uma molécula que é considerada sua efetora natural, Guanilil Ciclase solúvel (NO-sCG), uma enzima que converte GTP em cGMP mais difosfato. A formação de cGMP é fundamental para as respostas fisiológicas, como o relaxamento vascular e ereção peniana. Já no caso do iNOS, o cGMP não está diretamente envolvido na via de

sinalização, havendo descrição de mecanismo mais complexos. (69). O mecanismo de ativação de sCG por NO é complexa e ainda não é totalmente compreendido. Acredita-se que o NO induz o rompimento da ligação His-Fe (II) dentro do heme de sCG alterando sua estrutura conformacional, que resulta num aumento da atividade na conversão de GTC em cGMP. (69)

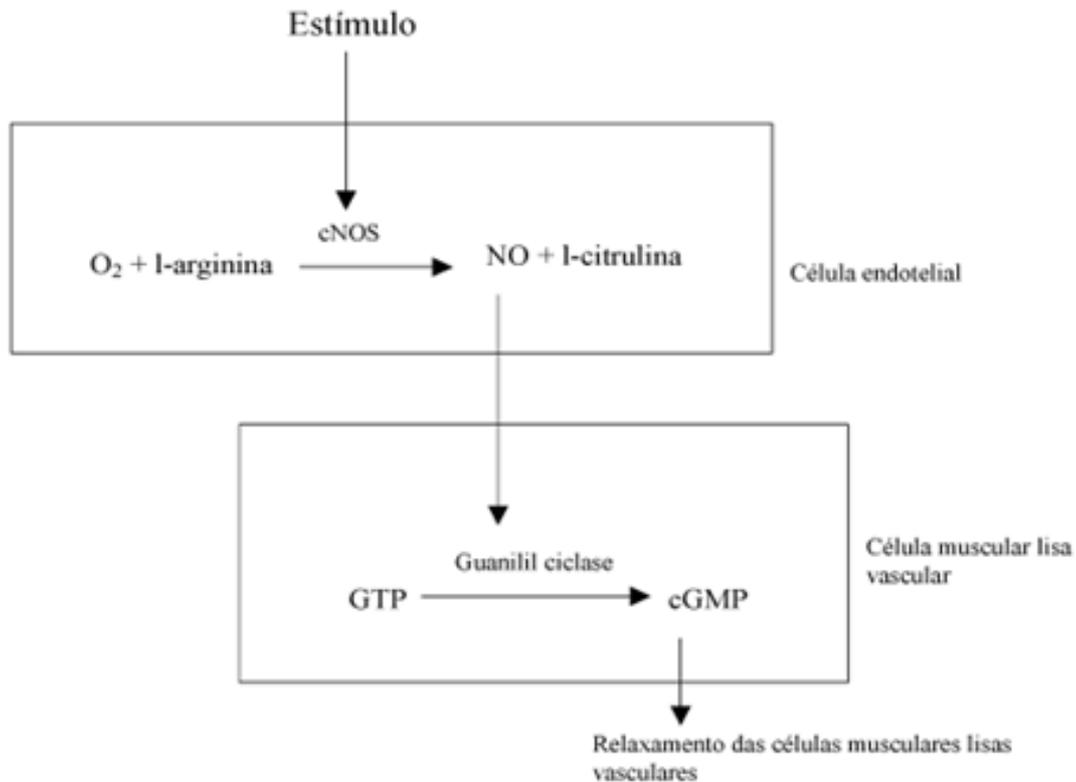


FIGURA 1 - Mecanismo de vasodilatação mediado pelo óxido nítrico (NO), em resposta a vários estímulos, como bradicinina ou acetilcolina.

Figura 4. Representação esquemática da formação de NO. O NO atua como relaxante nas células musculares, após a enzima cNOS ser ativada por estímulos nocivos. (www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502002000600011)

Muitos estudos realizados nos anos 90 demonstraram que a inibição local da síntese de NO na medula espinhal por inibidores administrados por via intratecal de NOS, tais como L-NAME e L-NMMA, que inibem todas as três isoformas de NOS de um modo não específico, conduziu a redução da resposta nociceptiva em vários modelos animais de dor inflamatória e neuropática. (70,71) Experiências mais recentes com inibidores seletivos de NOS e ratos deficientes de NOS revelou que a nNOS é a enzima produtora de NO mais

importante na medula espinhal durante o desenvolvimento e manutenção de dor inflamatória e neuropática. (72) A isoforma iNOS pode também contribuir para o processamento de dor inflamatória, enquanto que eNOS obviamente não está envolvido no processamento da dor. (72,73)

A sinalização pelo NO depende de vários mecanismos, incluindo a produção de cGMP após a ativação de NO-sCG, S-nitrosilação, nitrosilação da tirosina e a interação com o superóxido para formar peroxinitrito. (74) Há evidências consideráveis de que o NO-sCG é o mais importante alvo para o NO durante o processamento nociceptivo. Considerando as respostas nociceptivas agudas não são afetadas, os ratos CG-KO que demonstrou uma redução considerável no comportamento nociceptivo em modelos de dor neuropática e inflamatória. Estes dados sugerem que a síntese de NO mediada pelo cGMP não está envolvida em reflexos de dor aguda ou dor de sensibilização. (26)

O principal receptor intracelular de NO é a sCG. Sua ativação por meio do NO, resulta na conversão do trifosfato de guanosina para o segundo mensageiro cGMP. A via de NO-cGMP sinalização está presente em neurônios da medula espinhal e tem sido implicada na plasticidade sináptica, tais como a sensibilização central. (70)

Alguns estudos sugerem que a hiperalgesia térmica apresentada após a ligação do nervo ciático é mediada pela produção de NO e a subsequente ativação da sCG na medula espinhal lombar. (75) Estes resultados indicam que o NO pode desempenhar uma papel nos mecanismos centrais envolvidos no desenvolvimento de fenômenos nociceptivos após lesão inflamação periférica. (66) Além do papel de nociceptor do NO, várias linhas de evidência indicam que o NO induz a analgesia e também pode mediar o efeito anti-nociceptivo central e periférico de alguns compostos analgésicos, como opióides, anti-inflamatórios não esteroidais e produtos naturais. (76,77) Dados sugerem que a ação analgésica de NO também depende de uma via de sinalização intracelular envolvendo a formação de cGMP. Em adição aos dados que mostram que compostos doadores de NO induzem anti-nocicepção periférica, também se mostrou tal ação do NO ao nível central. (66)

Todos esses dados apresentados demonstram que o efeito analgésico do NO depende de uma via de sinalização intracelular. A primeira etapa nesta via envolve a formação de cGMP, ativação de PKG e a consequente abertura dos canais de K⁺. Outros

dados indicam também que a via NO-cGMP-PKG medeia o efeito analgésico de várias drogas, incluindo opiáceis, dipirona e alguns agentes anti-inflamatórios. Os mecanismos pelos quais estes fármacos estimulam a produção de NO não foram ainda bem caracterizadas. (66)

Prado et al. (78) observaram que diferentes doses de NO podem induzir um duplo efeito sobre o sistema nociceptivo. Estes autores demonstraram que a aplicação local de um creme contendo um doador de NO, SNAP (1% e 5%), reduziu significativamente a hiperalgisia tátil num modelo de dor incisional em patas de animais. O efeito anti-nociceptivo do doador foi detectado duas horas após a aplicação da droga e persistiu por pelo menos 24 horas. Em contraste, as concentrações mais elevadas de doadores de NO produziram menor efeito anti-nociceptivo. Além disso, um creme contendo 30% de SNAP causou um efeito hiperalgésico significativo, detectado 24 horas após a administração da droga. É importante salientar que o efeito anti-nociceptivo foi significativamente inibido apenas na pata tratada com o creme de SNAP, mas permaneceu inalterado no membro contralateral. (66) Esses dados, considerados em conjunto, indicam que o efeito pró ou anti-nociceptivo do NO depende do tipo e da fase do estímulo nociceptivo usado (mecânico ou térmico) (79–81) e que doadores ou inibidores de NO, dependendo da dose, poderiam causar nocicepção ou anti-nocicepção. (78,80)

O SNAP e o s-nitrosoglutationa (GSNO), têm sido utilizados em inúmeros estudos como molécula doadora de NO, porém poucos estudos abordaram suas vias de metabolização celular. (82)

2. *Objetivos*

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito do SNAP sobre processos dolorosos relacionados a córnea *in vitro* e *in vivo*, visando a possibilidade de sua aplicação como um modulador de dor ocular por meio do TRPV1.

2.1. *Objetivos Específicos*

1. Confirmar a diferença na expressão do TRPV1 na córnea de camundongos C57BL/6 e TRPV1-knockout, por meio de testes de imunofluorescência.
2. Comparar a viabilidade celular de células do epitélio da córnea de camundongos em cultura, após o tratamento com SNAP.
3. Comparar a resposta à estimulação dos receptores TRPV1 com CAP em células do epitélio corneano de camundongos C57BL/6 e TRPV1-knockout em cultura, tratadas ou não com SNAP, por meio de medidas de influxo de cálcio.
4. Comparar a resposta dolorosa em camundongos C57BL/6 e TRPV1-knockout, tratados ou não com SNAP, à estimulação corneana pela CAP.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Modelo Animal

Para este estudo foram utilizados 40 camundongos C57BL/6 machos de 15 a 20 gramas, fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Também foram utilizados 22 camundongos C57BL/6 machos TRPV1-knockout de 15 a 20 gramas, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Farmacologia do Campus da USP de Ribeirão Preto. Todos os animais foram acondicionados em caixas adequadas, com ração e água *ad libitum*.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (número do processo: CETEA 114/2006) (Anexo 1).

3.2. Cultura de células epiteliais da córnea

As córneas de 10 camundongos C57BL/6 e TRPV1-knockout foram coletadas após sedação com quetamina (0,15mL/Kg) e xilazina (0,15mL/Kg), por via peritoneal para posterior sacrifício por deslocamento da coluna cervical. A coleta foi realizada com instrumentos devidamente esterilizados e as amostras foram lavadas em solução fisiológica, colocando em placa de petri com 5,0 ml de solução balanceada *Hank's-HBSS* (GIBCO®, *Invitrogen Co.*, CA, EUA) e transportados num isopor com gelo até iniciar os procedimentos na capela de fluxo laminar. Sob condições assépticas, as corneas foram fragmentadas para utilização da região central da cornea e cortadas ao meio, utilizando pinça e tesoura cirúrgica, sendo posteriormente lavadas com 1,0 ml de *Hank's-HBSS* e colocadas, com o epitélio voltado para cima, em poços de cultura (placa de 24 poços) com 50 ul de Soro Fetal Bovino (SFB) e mantidas por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após este período, foi adicionado, por três dias, 50 ul de meio de cultura (DMEM-F12, gentamicina 50 µg/ml, antibiotic-antimycotic (100X) 1.25 µg/ml (*Invitrogen – GIBCO*, BRL, Grand Island, NY, USA), SFB 10% (*Sigma-Aldrich Co.*, Mo, EUA), insulina humana 5 µg/ml, DMSO 0.5%, hidrocortisona 0.5 µg/ml, fator de crescimento epidermal recombinante humano (hrEGF) e toxina cólera A subunidade 30 ng/ml (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, USA) e incubados em estufa a 37°C com 5% de CO₂. A troca de meio de cultura foi

realizada a cada dois dias e após 7 dias os tecidos foram removidos e analisados, em microscópio invertido, a proliferação de células epiteliais até número satisfatório para realização dos experimentos (Figura 2).¹⁴⁹

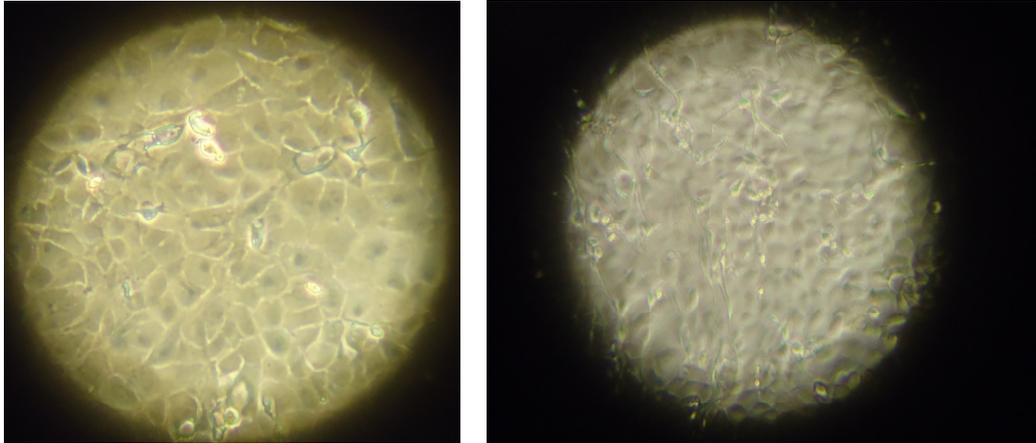


Figura 5. Microfotografia de uma cultura de células epiteliais da córnea de camundongo C57BL/6 macho no 12º dia e TRPV1 ^{-/-}, em primeira passagem e com confluência estimada em 80%. As imagens foram feitas em microscópio invertido para cultura celular TCM400 - Labo America, Fremont, CA, USA. Aumento 200x.

3.3. Tratamento com S-Nitroso-N-Acetilpenicilamina (SNAP)

Após o estabelecimento das culturas de células epiteliais da córnea dos camundongos C57BL/6 e TRPV1-knockout, seis poços de cultura com células originárias de cada linhagem animal, confluentes a 100%, foram tratadas com SNAP 1mM (Sigma Aldrich) durante 3 horas diluído no mesmo meio de cultura. Adicionalmente, outros seis poços de cada linhagem foram usados como controles, apenas com a troca concomitante de meio de cultura sem a droga testada. Após o período de tratamento, as amostras foram coletadas para realização dos experimentos, visando leituras em triplicatas.

3.4. Viabilidade Celular

Após o tratamento, o meio de cultura com a droga foi removido e os poços (em triplicatas) foram lavados com solução salina em tampão fosfato e tripsinizadas com 200 µl de Tripsina-EDTA 0,5% (Invitrogen – GIBCO, BRL, Grand Island, NY, EUA). Após 10 minutos de incubação e confirmação da liberação das células dos poços, adicionou-se 200 µl de meio de cultura, o qual foi homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm

(4°C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuspensão com 60 µl de meio de cultura. Então misturou-se 10 µl da suspensão de células com 10 µl da solução de azul de trypan 0.4% (Invitrogen - GIBCO, BRL, Grand Island, NY, USA). Após homogeneização, transferiu-se 10µl desta solução para lâmina específica de leitura no contador de células *Countess™ Automated Cell Counter* (Invitrogen Corporation, CA, EUA).

3.5. Medidas do Influxo de Cálcio

Após as células terem sido tratadas com SNAP nas triplicatas remanescentes, preparou-se 50 µl de uma suspensão contendo um total de $2,0 \times 10^4$ de células, a qual foi semeada em uma placa de cultura de 96 poços com paredes pretas. Foram adicionados 4 µl do reagente Fluo-3AM (4 µM) e incubado por 40 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO₂, seguida de centrifugação para lavagem com 200 µl de meio de cultura DMEM sem fenol (Invitrogen – GIBCO, BRL, Grand Island, NY, EUA) para a leitura no aparelho FlexStation, a fim de se analisar o influxo de cálcio intracelular por Unidade Relativa de Fluorescência (RFU).

Metade dos grupos foi estimulada com 50 µl de CAP 1 µl, injetada diretamente pelo equipamento na hora da leitura, para indução do influxo de cálcio, como forma de se discriminar a ativação do TRPV1 dentre os grupos, conforme descrito anteriormente por Gregory Smutzer e Roni K. Devassy (82).²⁰⁰ Em nosso modelo, as seguintes condições foram comparadas: controle, controle mais CAP, SNAP e SNAP mais CAP.

3.6. Imunofluorescência

Os globos oculares de um camundongo C57BL/6 e um camundongo TRPV1-knockout foram coletados após sedação com quetamina veterinária (75mg/kg) e xilazina (10mg/kg), por via peritoneal para posterior sacrifício por deslocamento da coluna cervical. Eles foram lavados em soro fisiológico, colocados em uma cubeta com Tissue-Tek O.C.T. (Optimal Cutting Temperature) e mergulhadas em acetona resfriada com gelo seco até total congelamento. Posteriormente, cortes de 10 µm de espessura foram realizados no criostato e distribuídos em lâminas silanizadas. Posteriormente, foram incubados com anticorpo primário VR1 (P-19) (sc 12498, goat polyclonal IgG, Santa Cruz) diluído 1:25 em

PBS+BSA por 2 horas e após lavagens com PBS, foram incubados com anticorpo secundário DnK pAb (goat IgG, Dy Light® 488, ab 96931) diluído 1:300 em PBS+BSA por 1 hora. A montagem das lâminas foram realizadas com *ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI (Life Technologies)*.

3.7. Avaliação comportamental de dor ocular

Os camundongos de ambas as linhagens foram submetidos ao tratamento com 1mM de SNAP (1 gota de 4uL em olho direito), de 1 em 1 hora por três vezes, e posteriormente estimulados com 1µM de CAP (1 gota de 4uL, única aplicação) para realização de filmagem do comportamento de dor animal relacionada ao estímulo (n = 5 por grupo), após aclimação animal ao ambiente de estudo. Os animais controles de cada linhagem foram submetidos apenas estimulação com 1µM de CAP para realização do mesmo protocolo de filmagem (n = 5 por grupo). Os vídeos gravados foram analisados de maneira mascarada para o examinador, por meio da contagem do número de movimento pata ao olho estimulado, em um minuto.

3.8. Análise Estatística

Os dados coletados foram apresentados, utilizando-se parâmetros usuais de estatística descritiva, por meio de frequência, média e erro padrão. Após testes de normalidade, os grupos foram comparados utilizando o teste não-paramétrico para variáveis contínuas U-Mann Whitney e Kruskal-Wallis (*software Prism 5.0 e GraphPad InStat - GraphPad Software Inc., CA, EUA*). Valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

4. *Resultados*

4. RESULTADOS

4.1. Ação do SNAP e CAP em cultura de células epiteliais

Os resultados obtidos pela análise do influxo de cálcio mostraram que a CAP induziu aumento significativo no influxo de cálcio quando comparado ao controle (sem adição de CAP) apenas nas amostras advindas de animais C57BL/6. Além disso, o tratamento com SNAP bloqueou significativamente o influxo de cálcio nestas amostras (teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,0077$). Não se observou nenhuma diferença significativa nas respostas de amostras de animais TRPV1-knockout, com os tratamentos realizados (Figura 3).

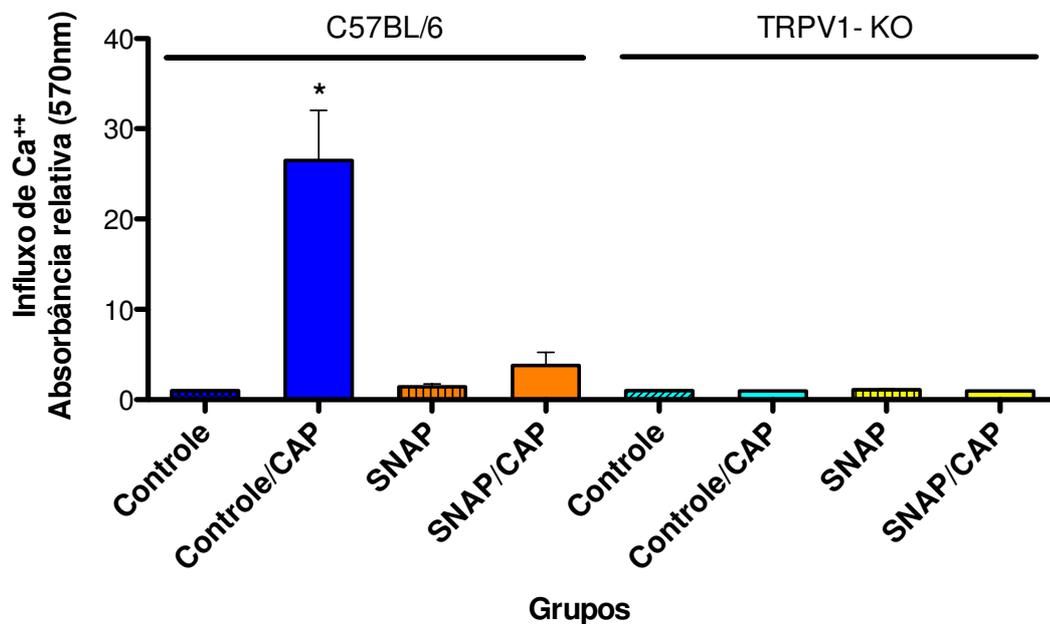


Gráfico 1. Influxo de cálcio realizado em cultura celular do epitélio da córnea de camundongos C57BL/6 e TRPV1- knockout, após 12 dias de cultura. Foram comparados os controles, CAP 1 μ M, SNAP 1mM e ambos SNAP/CAP.

4.2. Viabilidade da cultura de células epiteliais após tratamento

Não foram observadas diferenças significativas na viabilidade das células epiteliais da córnea em cultura (camundongos C57BL/6) com o tratamento com SNAP (1mM) (teste U de Mann-Whitney, $p = 0,2149$) (Figura 4).

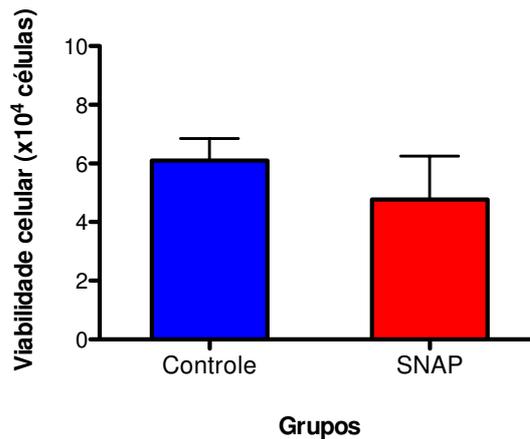


Gráfico 2. Comparação dos valores de viabilidade celular entre as amostras de células do grupo controle com as amostras de células do grupo tratado com SNAP (1nM).

4.3. Expressão corneana do TRPV1

Os globos oculares dos camundongos C57BL/6 apresentaram intensa marcação imunofluorescente aos receptores TRPV1 na camada basal do epitélio da córnea. Porém, não foram observadas marcações significativas nos camundongos TRPV1-knockout (Figura 5).

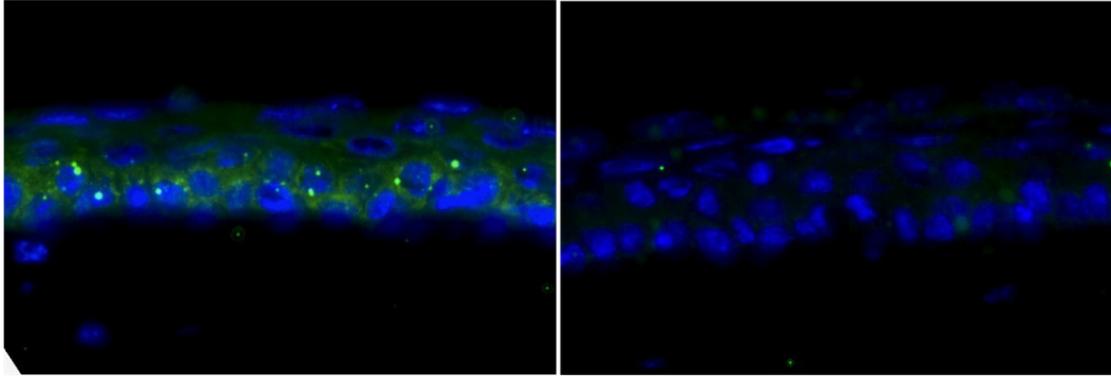


Figura 6. Fotomicrografias das córneas demonstrando a expressão do receptor TRPV1 (cor verde) por ensaio de imunofluorescência na camada basal do epitélio de camundongo C57BL/6 (esquerda) e sua ausência no camundongo TRPV1-knockout (direita). Além da marcação dos núcleos das células (cor azul). Aumento 400x.

4.4. Avaliação comportamental de dor ocular

Animais TRPV1-knockout apresentaram menores médias de piscadas após a estimulação com CAP que os animais C57BL/6, porém as diferenças não foram significativas. Os camundongos C57BL/6 pré-tratados com SNAP 1mM apresentaram diminuição significativa no número de movimento pata ao olho, em relação aos controles (teste U de Mann-Whitney; $p = 0,0101$). Tal tratamento não se acompanhou da observação da diminuição no número de movimento pata ao olho nos animais TRPV1-knockout (Figura 6).

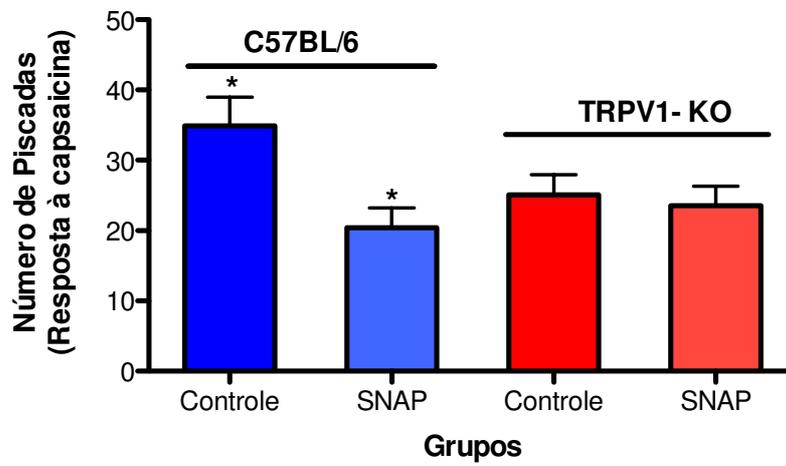


Gráfico 3. Distribuição do número de movimento pata ao olho em resposta a uma solução de CAP 1µM instilada nos camundongos C57BL/6 e TRPV1-knockout pré-tratados ou não com 1mM de SNAP (n= 10/grupo).

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a abundante expressão do receptor TRPV1 na camada basal do epitélio da córnea de camundongos C57BL/6, mas presença mais baixa nos animais TRPV1-knockout, nos quais a localização dos TRPV mostrou-se em neurônios e em diferentes tipos de células da córnea (84,85). Além disso, este trabalho mostrou que na cultura de células da córnea dos animais TRPV1-knockout não foi observado aumento do influxo de cálcio após estímulo com CAP, ao contrário do evidenciado em amostras dos animais selvagens (C57BL/6). Porém, o tratamento com SNAP nos animais selvagens se acompanhou da diminuição significativa do influxo de cálcio e do comportamento doloroso *in vivo*, ambos induzidos pela estimulação com CAP.

Esses resultados evidenciam a necessidade de se investigar mais sobre os doadores de NO como possíveis moduladores antinociceptivos, por meio do bloqueio observado no influxo de cálcio relacionado aos receptores TRPV1. Os dados revelaram que a SNAP inibiu o influxo de cálcio sem afetar a viabilidade das células, do mesmo modo que anteriormente fora observado em neurônios do gânglio da raiz dorsal, tendo reduzido significativamente a dor da córnea induzida por CAP em camundongos C57BL/6 (86).

Além disso, a presença de TRPV1 no epitélio da córnea, foi recentemente descrita e correlacionada com diferenças significativas na dinâmica de cicatrização de lesões corneanas, mas também com uma inflamação mais intensa, em resposta à agressão provocada (86,87).

Os camundongos TRPV1-knockout proporcionaram várias observações comparativas com modelos animais que normalmente possuem esse receptor. O aspecto comportamental, número de movimento pata ao olho, e sua reação foi avaliado em camundongos TRPV1-knockout, porém não foi significativo após estimulação com CAP e nem os pré-tratados. Mas nos camundongos C57BL/6 pré-tratados com SNAP, o número de movimento pata ao olho, diminuiu significativamente em relação ao controle. Neste estudo também avaliamos os aspectos dolorosos entre os camundongos C57BL/6 e os TRPV1 -knockout após provocação de dor com uma aplicação única tópica ocular de CAP revelando menor sensibilidade corneana nos camundongos TRPV1-knockout, medida pelo número de movimento pata ao olho, quando comparados com os camundongos normais.

Um estudo anterior mostrou que o SNAP interfere com o influxo de cálcio sobre os canais de cálcio por um mecanismo recentemente detalhado. Nstes estudo o autor revela que resíduos de cisteína citoplasmático servem como NO sensores para canais de cálcio HVA (89).

A redução da dor induzida em resposta à estimulação com CAP em camundongos C57BL/6, mas não em TRPV1-knockout, com o tratamento com SNAP aumenta a chance potencial de seu uso como um medicamento tópico analgésico, uma vez que a ativação de receptores TRPV1 promovem o desencadeamento de sinalização dolorosa. Um estudo rescente, mostra a sensibilização de nociceptores após ceratite por radiação UV pela provavel ação de mediadores inflamatórios nos canais TRP expreso seletivamente nos terminais nervosos sensoriais (90).

Além disso, estudos sugerem que a concentração de NO liberado pode ser determinante para explicar efeitos anti ou pró-nociceptivos. Como por exemplo, doses elevadas de SIN1, outro doador de NO, podem causar dor neuropática, mas o mesmo usado em doses reduzidas age como anti-nociceptivo. Observado por uma complexa curva de dose-resposta após 20 minutos da administração intratecal nos animais. (65,80). Tais observações indicam a necessidade de acerto cuidadoso das doses tópicas do SNAP, quando de sua aplicação em eventuais estudos pré-clínicos, utilizando outras espécies, e de eficácia em humanos.

Em resumo, o presente estudo mostra o envolvimento dos receptores TRPV1 em processos nociceptivos corneanos, comprovado por meio das diferenças observadas nas respostas a estímulos celulares e comportamentais em camundongos TRPV1-knockout. E a inibição do influxo de cálcio através do TRPV1 mediada pelo SNAP pode ser associada ao controle da dor aguda na córnea induzida por CAP. Estes resultados aumentam as expectativas para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o alívio da dor corneana, por meio de uso de colírios contendo doses adequadas de doadores de NO.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

1. Os receptores TRPV1 se localizam na camada basal do epitélio da córnea dos camundongos C57BL/6, porém não se observou expressão significativa deste receptor em córneas de animais TRPV1-knockout.
2. Não foi observada diferença significativa na viabilidade de células do epitélio da córnea em cultura com o tratamento com SNAP 1mM.
3. O tratamento com SNAP 1mM promoveu a inibição significativa do aumento observado no influxo de cálcio induzido pela CAP em células da córnea de camundongos C57BL/6. Amostras celulares de animais TRPV1-knockout apresentaram menores valores de influxo de cálcio que os controles selvagens, sem diferenças significativas com tratamento com SNAP 1mM.
4. Os camundongos C57BL/6 pré-tratados com SNAP 1mM apresentaram menor resposta dolorosa à estimulação com CAP, caracterizada pelo menor número de movimento pata ao olho, fato não observado em animais TRPV1-knockout.

7. Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jack J. e Brad Bowling. *Oftalmologia Clínica: uma abordagem sistemática*. Editora elsevier. 7^a edição. 2012.
2. Hindman HB. Rationale for Adjunctive Topical Corticosteroids in Bacterial Keratitis. *Arch Ophthalmol* [Internet]. 2009;127(1):97. Available from: <http://archophth.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archophthalmol.2008.504>
3. Delmonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cart Refract Surg* [Internet]. ASCRS and ESCRS; 2011;37(3):588–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrs.2010.12.037>
4. Wiley L, Sundarraj N, Thofr RA. Regional Heterogeneity in Human Corneal and Limbal Epithelia: An Immunohistochemical Evaluation. 2016;32(3):594–602. Available from: <http://www.iovs.org.abc.cardiff.ac.uk/content/32/3/594.full.pdf>
5. Boote C1, Dennis S, Newton RH, Puri H MK. Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: optical and biomechanical implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(7):2941–8.
6. Boller F. Letter to the editors. *J Hist Neurosci* [Internet]. 2011;20(4):379–80. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84855829364&partnerID=40&md5=f05373cd2d5e71213501a5198835d129>
7. Müller LJ, Pels E, Vrensen GF. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(4):437–43.
8. Oliveira-Soto L1 EN. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea*. 2001;May(20(4)):374–84.
9. Müller LJ, Pels L, Vrensen GF. 22. Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(4):476–88.
10. Shaheen BS, Bakir M, Jain S. ScienceDirect Corneal nerves in health and disease. *Surv Ophthalmol* [Internet]. Mosby, Inc; 2014;59(3):263–85. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.survophthal.2013.09.002>

11. Belmonte C1, Acosta MC GJ. Neural basis of sensation in intact and injured corneas. *Exp Eye Res.* 2004;78(3)(513-25).
12. Deibel JP. Ocular Inflammation and Infection. *Emerg Med Clin NA* [Internet]. Elsevier Inc; 2013;31(2):387–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.emc.2013.01.006>
13. Dargin JM, Lowenstein RA. *The Painful Eye.* 2008;26:199–216.
14. Stapleton F, Carnt N. Contact lens-related microbial keratitis: how have epidemiology and genetics helped us with pathogenesis and prophylaxis. *Eye (Lond)* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;26(2):185–93. Available from: <http://www.mendeley.com/catalog/contact-lensrelated-microbial-keratitis-epidemiology-genetics-helped-pathogenesis-prophylaxis/>
15. Chang JH, McCluskey PJ, Wakefield D. Acute anterior uveitis and HLA-B27. *Surv Ophthalmol.* 2005;50(4):364–88.
16. Thomas PA. Fungal infections of the cornea. *Eye (Lond)* [Internet]. 2003;17(8):852–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14631389>
17. Banerjee S, Patwardhan A, Savant V V. Mass photokeratitis following exposure to unprotected ultraviolet light. *J Public Health Med.* 2003;25(2):160.
18. Martínez-ruiz A, Cadenas S, Lamas S. Free Radical Biology & Medicine Nitric oxide signaling : Classical , less classical , and nonclassical mechanisms. *Free Radic Biol Med* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;51(1):17–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.010>
19. Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain : clinical manifestations and mechanisms. *Lancet Neurol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;13(9):924–35. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70102-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70102-4)
20. Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, et al. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*

- [Internet]. 2007 Jul 12 [cited 2016 Feb 29];448(7150):204–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17538622>
21. Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* [Internet]. 2008;28(10):2485–94. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2709206&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
 22. Apkarian AV, Bushnell MC, Treede R-D, Zubieta J-K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain* [Internet]. 2005 Aug [cited 2016 Feb 29];9(4):463–463. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.ejpain.2004.11.001>
 23. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Review Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. 2009;267–84.
 24. Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(1):55–68.
 25. Mergler S, Garreis F, Sahlmüller M, Reinach PS, Paulsen F, Pleyer U. Thermosensitive transient receptor potential channels in human corneal epithelial cells. *J Cell Physiol*. 2011;226(7):1828–42.
 26. Osenthal PER. The Corneal Pain System . Part I : The Missing Piece of the Dry Eye Puzzle *. 2012;10(1):2–14.
 27. Woolf CJ, Safieh-Garabedian B, Ma QP, Crilly P, Winter J. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience*. 1994;62(2):327–31.
 28. Lewin GR1, Rueff A ML. Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. *Eur J Neurosci*. 1994;6(12):1903–12.
 29. Tominaga M, Calerina MJ. Thermosensation and pain. *J Neurobiol*. 2004;61(1):3–12.

30. Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2003 Jul [cited 2016 Feb 29];4(7):529–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12838328>
31. Voets T, Talavera K, Owsianik G, Nilius B. Sensing with TRP channels. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2005 Jul [cited 2016 Feb 29];1(2):85–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16408004>
32. Yoo S, Lim JY, Hwang SW. Sensory TRP channel interactions with endogenous lipids and their biological outcomes. *Molecules* [Internet]. 2014 [cited 2016 Feb 29];19(4):4708–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24739932>
33. Choi S, Yoo S, Lim JY, Hwang SW. Are Sensory TRP Channels Biological Alarms for Lipid Peroxidation ? 2014;16430–57.
34. Nishihara E, Hiyama TY, Noda M. Osmosensitivity of transient receptor potential vanilloid 1 is synergistically enhanced by distinct activating stimuli such as temperature and protons. *PLoS One*. 2011;6(7).
35. Caterina MJ1, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD JD. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389(6653):816–24.
36. Linley JE, Ooi L, Pettinger L, Kirton H, Boyle JP, Peers C, et al. Reactive oxygen species are second messengers of neurokinin signaling in peripheral sensory neurons. *Pnas*. 2012;109(24).
37. Natura G1, von Banchet GS SH. Calcitonin gene-related peptide enhances TTX-resistant sodium currents in cultured dorsal root ganglion neurons from adult rats. *Pain*. 2005;116(3):194–204.
38. Koplas PA, Rosenberg RL, Oxford GS. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*. 1997;17(10):3525–37.

39. Docherty RJ1, Yeats JC, Bevan S BH. Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflugers Arch.* 1996;Apr(431(6)):828–37.
40. Early C, Aspirin G. Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. 1999;51(2).
41. Caterina MJ1 JD. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:487–517.
42. Ew INVITEDREVI. Structure and function of TRPV1. 2005;143–50.
43. Jung J, Hwang SW, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Kim WB, et al. Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J Neurosci.* 1999;19(2):529–38.
44. Jordt SE, Tominaga M, Julius D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(14):8134–9.
45. Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C ϵ and identification of two target serine residues. *J Biol Chem.* 2002;277(16):13375–8.
46. Tominaga M, Wada M, Masu M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(12):6951–6.
47. Puntambekar P. Direct Interaction of Adenosine with the TRPV1 Channel Protein. *J Neurosci* [Internet]. 2004;24(14):3663–71. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4773-03.2004>
48. Liu L1 SS. Capsaicin-induced currents with distinct desensitization and Ca²⁺ dependence in rat trigeminal ganglion cells. *J Neurophysiol.* 1996;Apr(75(4)):1503–14.
49. Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H, Tominaga M. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(13):8002–6.

50. Chevesich J, Kreuz AJ, Montell C. Requirement for the PDZ domain protein, INAD, for localization of the TRP store-operated channel to a signaling complex. *Neuron*. 1997;18(1):95–105.
51. Scott K, Sun Y, Beckingham K, Zuker CS. Calmodulin regulation of drosophila light-activated channels and receptor function mediates termination of the light response in vivo. *Cell*. 1997;91(3):375–83.
52. Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H, Mizumura K. Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol* [Internet]. 2002;88(1):544–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12091579>
53. Gopinath P, Wan E, Holdcroft A, Facer P, Davis JB, Smith GD, et al. Increased capsaicin receptor TRPV1 in skin nerve fibres and related vanilloid receptors TRPV3 and TRPV4 in keratinocytes in human breast pain. *BMC Womens Health*. 2005;5:2.
54. Gow AJ. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *AJP Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2004;287(2):L262–8. Available from: <http://ajplung.physiology.org/content/287/2/L262>
55. Stamler JS. Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*. 1994;78(6):931–6.
56. Zhang Y, Hogg N. S -Nitrosothiols : cellular formation and transport. 2005;38:831–8.
57. Padgett CM, Whorton AR. Cellular responses to nitric oxide: role of protein S-thiolation/dethiolation. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 1998;358(2):232–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.idealibrary.com/links/citation/0003-9861/358/232>
58. Clancy RM1 AS. Novel synthesis of S-nitrosoglutathione and degradation by human neutrophils. *Anal Biochem*. 1992;Aug 1(204(2)):365–71.
59. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 1998;21(3):531–43.

60. Julius D. TRP Channels and Pain. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2013 Oct 6 [cited 2016 Feb 29];29(1):355–84. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-cellbio-101011-155833>
61. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* [Internet]. 2000 Apr 14 [cited 2016 Feb 29];288(5464):306–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764638>
62. Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* [Internet]. 2000;405(6783):183–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10821274 \n <http://www.nature.com/nature/journal/v405/n6783/pdf/405183a0.pdf>
63. Toriyabe M1, Omote K, Kawamata T NA. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. *Anesthesiology*. 2004;Oct(101(4)):983–90.
64. Chen Y, Boettger MK, Reif A, Schmitt A, Uçeyler N, Sommer C. Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice. *Mol Pain*. 2010;6:13.
65. Freire MAM, Guimar??es JS, Leal WG, Pereira A. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. *Front Neurosci*. 2009;3(SEP):175–81.
66. Cury Y, Picolo G, Pacciari V, Henrique S. Nitric Oxide Pain and analgesia : The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;25(3):243–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2011.06.004>
67. Miyamoto T, Dublin AE, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS One*. 2009;4(10).
68. Miclescu A, Gordh T. Nitric oxide and pain: “Something old, something new.” *Acta*

- Anaesthesiol Scand. 2009;53(9):1107–20.
69. Schmidtko A, Tegeder I, Geisslinger G. No NO , no pain ? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. 2009;(May):339–46.
 70. Meller ST1 GG. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. Pain. 1993;Feb(52(2)):127–36.
 71. Luo ZD1 CD. The role of nitric oxide in nociception. Curr Rev Pain. 2000;(4(6)):459–66.
 72. Gühring H, Görig M, Ates M, Coste O, Zeilhofer HU, Pahl A, et al. Suppressed injury-induced rise in spinal prostaglandin E2 production and reduced early thermal hyperalgesia in iNOS-deficient mice. J Neurosci. 2000;20(18):6714–20.
 73. Tao F, Tao YX, Zhao C, Dor?? S, Liaw WJ, Raja SN, et al. Differential roles of neuronal and endothelial nitric oxide synthases during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia. Neuroscience. 2004;128(2):421–30.
 74. Bian K, Ke Y, Kamisaki Y, Murad F. Proteomic modification by nitric oxide. J Pharmacol Sci. 2006;101(4):271–9.
 75. Meller ST, Pechman PS, Gebhart GF, Maves TJ. Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. Neuroscience [Internet]. 1992;50(1):7–10. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030645229290377E>
 76. Kawabata A, Fukuzumi Y, Fukushima Y, Takagi H. Antinociceptive effect of L-arginine on the carrageenin-induced hyperalgesia of the rat: possible involvement of central opioidergic systems. Eur J Pharmacol. 1992;218(1):153–8.
 77. Picolo G, Cury Y. Peripheral neuronal nitric oxide synthase activity mediates the antinociceptive effect of Crotalus durissus terrificus snake venom, a δ - and κ -opioid receptor agonist. Life Sci. 2004;75(5):559–73.
 78. Prado W a, Schiavon VF, Cunha FQ. Dual effect of local application of nitric oxide

- donors in a model of incision pain in rats. *Eur J Pharmacol.* 2002;441(1-2):57–65.
79. da S Rocha JC, Peixoto MEB, Jancar S, de Q Cunha F, de A Ribeiro R, da Rocha F a C. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol.* 2002;136(4):588–96.
 80. Sousa a M, Prado W a. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res.* 2001;897(1-2):9–19.
 81. Anbar M, Gratt BM. Role of nitric oxide in the physiopathology of pain. *J Pain Symptom Manage.* 1997;14(4):225–54.
 82. Morales-I SL, Simon SA, Rosenbaum T. The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *2013;13:3109–21.*
 83. Smutzer G, Devassy RK. Integrating TRPV1 Receptor Function with Capsaicin Psychophysics. Hindawi Publishing Corporation; 2016;2016.
 84. Yang Y, Yang H, Wang Z, Mergler S, Wolosin JM, Reinach PS. Functional TRPV1 expression in human corneal fibroblasts. *Exp Eye Res.* 2013;107:121–9.
 85. Mergler S, Valtink M, Coulson-Thomas VJ, Lindemann D, Reinach PS, Engelmann K, et al. TRPV channels mediate temperature-sensing in human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res [Internet].* 2010 Jun [cited 2016 Mar 2];90(6):758–70. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014483510000850>
 86. Jin Y, Kim J, Kwak J. Activation of the cGMP/protein kinase G pathway by nitric oxide can decrease TRPV1 activity in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2012;16(3):211–7.
 87. Okada Y, Reinach PS, Shirai K, Kitano A, Kao WWY, Flanders KC, et al. TRPV1 involvement in inflammatory tissue fibrosis in mice. *Am J Pathol [Internet].* Elsevier Inc.; 2011;178(6):2654–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.043>

88. Sumioka T, Okada Y, Reinach PS, Shirai K, Miyajima M, Yamanaka O, et al. Impairment of corneal epithelial wound healing in a TRPV1-deficient mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2014 May [cited 2016 Mar 14];55(5):3295–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24781945>
89. Zhou M-H, Bavencoffe A, Pan H-L. Molecular Basis of Regulating High Voltage-Activated Calcium Channels by S-Nitrosylation. *J Biol Chem* [Internet]. 2015 Oct 27 [cited 2016 Mar 2];jbc.M115.685206. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M115.685206>
90. Acosta MC, Luna C, Quirce S, Belmonte C, Gallar J. Corneal sensory nerve activity in an experimental model of UV keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2014 Jun [cited 2016 Mar 14];55(6):3403–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24787567>

7. Anexos



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº **038/2013**, sobre o projeto intitulado “*Sinalização da inflamação e proliferação celular do epitélio da córnea.*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Eduardo Melani Rocha** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de maio de 2013.

We certify that the protocol nº **038/2013**, entitled “*Signaling of inflammation and cellular proliferation of the corneal epithelium*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in **05/27/2013**.

Ribeirão Preto, 27 de maio de 2013.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal FMRP-USP