UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LARA CRISTINA DIAS

Identificação e ações do receptor vanilóide de potencial transitório 1 (TRPV-1) na superfície ocular e glândula lacrimal

Ribeirão Preto
2015

LARA CRISTINA DIAS

Identificação e ações do receptor vanilóide de potencial transitório 1 (TRPV-1) na superfície ocular e glândula lacrimal

Versão Corrigida

(Versão Original Disponível na Secretaria do Programa)

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. Eduardo Melani Rocha.

Ribeirão Preto
2015

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

Catalogação da Publicação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Dias, Lara Cristina

Identificação e ações do receptor vanilóide de potencial transitório 1 (**TRPV-1**) na superfície ocular e glândula lacrimal. Ribeirão Preto, 2015.

85 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. Eduardo Melani Rocha

1. mediadores inflamatórios. 2. epitélio da córnea. 3. receptores. 4. vias de sinalização.

Nome: DIAS, Lara Cristina.

Título: Identificação e ações do receptor vanilóide de potencial transitório 1 (**TRPV-1**) na superfície ocular e glândula lacrimal

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

Aprovada em: 13 de novembro de 2015

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rubens Bertazolli Filho — Instituição: UFPR
Julgamento: Aprovada — Assinatura: _____

Profa. Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues — Instituição: FMRP-USP
Julgamento: Aprovada — Assinatura: _____

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha — Instituição: FMRP-USP
Julgamento: Aprovada — Assinatura: _____

Dedicatória

A **Deus**, Pai da Eternidade e Príncipe da Paz

Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento. Provérbios 2:6

Aos meus pais, **Cezar** e **Ana Esméria**, pelo interminável amor, compreensão, apoio, carinho e exemplo de bondade.*"Eis o meu segredo. É muito simples: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos".* A.Saint-Exupèry

À minha irmã **Ana Carolina** que sempre esteve ao meu lado, me dando força e acima de tudo acreditou que eu seria capaz de cumprir mais este desafio. "*O que significa cativar? É uma coisa muito esquecida... Significa "criar laços"".* A. Saint-Exupéry*.*

Ao meu irmão **Guilherme** que além de irmão é um grande amigo e mesmo distante, sempre me incentivou. *"As estrelas são belas por causa de uma flor que não se pode ver..."* A. Saint-Exupéry*.*

Às minhas sobrinhas **Liz**, **Isabela** e **Mel** pela alegria e amor que me fazem sentir cada dia mais. Minha vida é mais feliz com vocês. *"Só as crianças sabem o que buscam... Gastam tempo com uma boneca de trapos, que se torna muito importante, e se ela lhes é tirada, choram..."*A. Saint-Exupéry*.*

Agradecimento Especial

Ao meu orientador Prof. Dr. **Eduardo Melani Rocha** por sua determinação, perseverança, dedicação, paciência, respeito e todos os ensinamentos a mim dedicados e principalmente o amor pela ciência.“*Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que tu cativas.”* A. Saint-Exupéry.

Agradecimentos

Ao meu namorado **Lucas**, que sempre me incentivou e me apoiou em todas as decisões.

A toda equipe técnica da casa 19, **Maria de Fátima**, **Marina Fantucci**, **Maria Helena (Lenucha)** e **Adriana Murashima** pela amizade e companheirismo e ensinamentos a mim passados. Ao **Denny Marcos** por todo conhecimento em estatística e sempre esteve pronto para ajudar. Meu muito obrigada!

Ao **Luis Fernando** pela sincera amizade, pelo apoio e eficiência em todas as atividades.

À **Carol** e à **Larissa** pela amizade e todo o conhecimento dos mais diversos assuntos que me foi passado sempre com muita paciência e boa vontade.

À **Lilian Eslaine**, técnica do laboratório multiusuários pela paciência e boa vontade em me ensinar técnicas deste trabalho.

À equipe do Laboratório do Prof. Dr. **Thiago Cunha** pelo apoio técnico.

Ao Prof. Dr.**Jayter de Paula**, pelas dicas e conhecimento amplo nos mais diversos assuntos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. **Peter Reinach** que mesmo distante colaborou muito para que este projeto fosse realizado.

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

Aos funcionários do **Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgiade Cabeça e Pescoço da FMRP Maria Cecília** por toda sua paciência, orientação, carinho e processamento do material, e **Rogério Castania** por todo apoio.

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 serem dedicados à pesquisa e por sempre me receberem com carinho.

Aos apoios financeiros **CAPES**, **FAPESP (2013/18350-8) e NAP-FTO** por toda colaboração e serviços prestados a esta pesquisa.

RESUMO

DIAS, L.C. **Identificação e ações do receptor vanilóide de potencial transitório 1 (TRPV-1) na superfície ocular e glândula lacrimal.** 2015. 85 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Doenças da córnea estão entre as principais causas de cegueira e os mecanismos de lesão e reparação estão em grande parte concentrados no epitélio, porém os mediadores e alvos para possíveis intervenções terapêuticas são pouco conhecidos. Nas agressões ao epitélio da córnea, a ativação dos receptores vanilóides de potencial transitório 1 (**TRPV1**) leva à sinalização inflamatória e cicatricial. O objetivo desse trabalho foi identificar os mecanismos de sinalização e resposta do TRPV1 na córnea de animais experimentais. O cultivo de células epiteliais de córnea de ratos foi usado para a identificação de receptores TRPV1 e canabinóide (CB1) por *western blot*, influxo de cálcio e resposta de citocinas medidas após estímulo com Capsaicina a 1µM (CAP) por ELISA. Ensaio quantitativo de PCR em tempo real (RNAm) e a investigação histológica e imunohistoquimica foram usados na córnea e glândula lacrimal (GL) após estímulos nocioceptivos ou inflamatórios em modelos animais, sejam ratos com Diabetes *Mellitus* (DM) por 8 semanas ou expostos a cloreto de benzalcônio a 0,2% (BAC) por 7 dias. Camundongos TRPV1-/- foram comparados aos controles C57 sem estímulo, ou sob estímulo único com Capsacina (CAP) a 1µM, cloreto de banzalcônio a 0,2 % (BAC) por 7 dias ou após queimadura alcalina com NaOH a 1M. Os resultados mostraram a presença de TRPV1 em epitélio de córnea em cultura primária, que essas células respondem com influxo de cálcio (p=0,0411) e aumento de TNFα e IL-1β ao estímulo com o agonista CAP a 1µM (sendo máximo nas combinações de CAP com seu antagonista Capsazepina e CAP com Win, um agonista canabinóide, todos a 1µM). Em ratos com DM ocorreu a redução da expressão do RNAm de IL-1β e IL-6 na córnea (p=0,0159, para ambos),e de TNF-α no grupo BAC (p=0,0159). Os camundongos TRPV1-/- tem fenótipo físico e ocular normal, porém reduzida sensibilidade a CAP 1µM. O tratamento com BAC leva à diminuição da secreção lacrimal (p=0,0011) e na GL dos camundongos machos e fêmeas não apresentaram diferença na expressão do RNAm

dos mediadores inflamatórios IL-1β e TNF-α (p=0,1620, p=0,9876 e p=0,0541, p=0,4088, respectivamente. A queimadura alcalina com NaOH 1M resultou em melhor cicatrização no grupo TRPV1-/-. Em conclusão, o TRPV1 está presente na córnea e atua em resposta a agressões externas. Situações adquiridas como DM e toxicidade por BAC, reconhecidas como neuropáticas, diminuem a expressão de mediadores inflamatórios associados a TRPV1. A ausência genética de TRPV1 não altera o fenótipo, mas resulta em menor sensibilidade a dor e melhor cicatrização da superfície ocular após queimadura alcalina.

Palavras-chave: mediadores inflamatórios, epitélio da córnea, receptores, vias de sinalização.

ABSTRACT

DIAS, L.C. **Identification and actions of transient receptor potencial vanilloid type 1 (TRPV-1) on ocular surface and lacrimal gland.** 2015. 85 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Corneal diseases are among the leading causes of blindness. Damage and repair mechanisms are largely concentrated in the epithelium, but the mediators and targets for possible therapeutic interventions are poorly understood. In aggressions to the corneal epithelium, the activation of vanilloid receptors transient potential 1 (TRPV1) leads to inflammatory and wound healing signaling. The aim of this study was to identify the signaling mechanisms and TRPV1 response in the cornea of experimental animals. The culture of rat cornea epithelial cells was applied to identify the receptores TRPV1 and cannabinoid (CB1) by western blot analysis, measurement of calcium influx, cytokine expression measured by ELISA after challenge with Capsaicin 1µM. Real time PCR (mRNA), histological and immunohistochemical investigation were applied on cornea and lacrimal gland (LG) after nocioceptive or inflammatory stimuli in animal models of diabetes mellitus (DM) for 8 weeks, or exposed to benzalkonium chloride at 0.2% (BAC) for 7 days. Mice TRPV1-/- compared to control C57 naive or under single stimulation with 1µMCAP, BAC 0.2% for 7 days or after the alkali burn with 1M NaOH. The results showed the presence of TRPV1 in cornea epithelium in primary culture, also that these cells respond to CAP 1 µM with calcium influx (p=0.0411) and increase of TNFα and IL-1β (being maximum at the CAP + CPZ combinations and Win + CAP, respectively). In rats with DM the expression of IL-1β and IL-6 mRNA was reduced in the cornea (p=0.0159, for both), and TNF-α on BAC group (p=0.0159). The TRPV1-/- mice have normal physical and ocular phenotypes but low sensitivity to CAP 1µM. Treatment with BAC leads to decreased tear secretion (p=0.0011) and GL males and females mice showed no difference in the mRNA expression of inflammatory mediators IL-1β and TNF-α (p=0.1620, p=0.9876 and p=0.0541, p=0.4088, respectively).The alkaline burn with 1M NaOH resulted in better healing and greater epithelial thickness in TRPV1-/- group. In conclusion, TRPV1 is present in the cornea and operates in

response to external aggressions. Situations as DM and BAC toxicity, recognized as neuropathic, decrease the expression of inflammatory mediators associated with TRPV1. Genetic absence and TRPV1 does not change the phenotype, but result in lower pain sensitivity and improved wound healing of the ocular surface after alkaline burn.

Keywords: inflammatory mediators, corneal epithelium, receptors, signaling pathways.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - As cinco camadas da córnea humana..... 21

Figura 2 - Representação esquemática de TRPV1 (receptor de capsaicina)……. 29

Figura 3 - Via de transdução de sinal Ca^{2+} ativadas pelo agonista de CB1…..… 32

Figura 4 - Desenho do estudo: análises realizadas para cada grupo de animais……..…… 39

Figura 5 - Cultura das células epiteliais da córnea e resposta a estímulos ao TRPV1 e CB1..... 51

Figura 6 - Papel do TRPV1 em córnea e GL de ratos com DM..... 53

Figura 7 - Papel do TRPV1 em córnea e GL de ratos tratados com colírio BAC 0,2%..... 54

Figura 8 - A superfície ocular e resposta à agressão à córneanos camundongos TRPV1-/-..... 55

Figura 9 - Provocação com colírio CAP a 1µM..... 57

Figura 10 - Modelo de lesão corneana por colírio BAC 0,2% 59

Figura 11 - Expressão relativa de RNAm de IL-1β, IL-6, TNFα e TRPV1 naGL de camundongos machos e fêmeas tratados com colírio BAC 0,2% por PCR em tempo real..... 60

Figura 12 - Queimadura da córnea de camundongos com NaOH 1M..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos de animais em estudo..... 39

Tabela 2 - Anticorpos utilizados nas técnicas de *Western blotting* e Imunofluorescência para cultura celular da córnea de ratos..... 43

Tabela 3 - Genes alvos de ratos e camundongos investigados utilizados nos ensaios de PCR em tempo real (Life Technologies).. 47

Tabela 4 - Expressão relativa de RNAm de IL-1β, IL-6, TNFα e TRPV1 na GL de camundongos machos e fêmeas tratados com colírio BAC 0,2%, por PCR em tempo real..... 60

LISTA DE ABREVIATURAS

BAC	Cloreto de Benzalcônio
β	Beta
Ca^{2+}	Cálcio
CAP	Capsaicina
Céls	Células
CB1	Receptor Canabinóide
CPZ	Capsazepina
DM	Diabetes *Mellitus*
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Dl	Decilitro
DRG	Gânglio da Raiz Dorsal
F	Fêmea
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNFα	Fator de Necrose Tumoral Alfa
GL	Glândula Lacrimal
GO	Globo Ocular
GT	Gânglio Trigêmeo
G	Grama
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
Κ	Kappa
L	Litro

α	Alfa
M	Macho
Min	Minutos
Mg	Miligrama
Mm	Milímetro
m/Osmol	Miliosmol
N	Númerode amostras ou animais utilizados por experiment
n°	Número
NaOH	Hidróxido de sódio
RD	Retinopatia Diabética
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAm	Ácido Ribonucléico Mensageiro
RT-PCR	Reação da Cadeia de Polimerase em Tempo Real
RTX	Resiniferatoxina
Seg	Segundos
SO	Superfície Ocular
TRP	Receptor de Potencial Transitório
TRPV1	Receptor Potencial Transitório Vanilóide 1
USP	Universidade de São Paulo
µm	Micrômetro
WB	*Western Blotting*
WIN 55, 212-2	Agonista de CB1
-/-	*Knockout*

SUMÁRIO

1.	**INTRODUÇÃO**	20
1.1.	***Epitélio da córnea***	20
1.2.	***Superfície ocular***	21
1.3.	***Glândula lacrimal***	22
1.4.	***Diabetes mellitus***	23
1.5.	***Receptor do potencial transitório vanilóide 1***	25
1.5.1.	*Capsaicina*	26
1.5.2.	*Capsazepina*	27
1.5.3.	*Canais de cálcio*$^{+}$	27
1.6.	***Mediadores inflamatórios***	29
1.7.	***Receptor canabinóide (CB1)***	31
1.7.1.	*Win 55, 212-2*	32
1.8.	***1.7. Lesão corneana por NaOH e BAC***	33
2.	**OBJETIVOS**	36
2.1.	*Objetivos específicos*	36
3.	**MATERIAL E MÉTODOS**	38
3.1.	***Modelo animal***	38
3.1.1.	*Desenho e Grupos em Estudo*	38
3.2.	***Cultura de células epiteliais da córnea***	40
3.3.	***Modulação do meio de cultura***	40
3.4.	***Contagem celular***	41
3.5.	***ELISA***	41
3.6.	***Western blotting***	41
3.7.	***Ativação do TRPV1 monitorado pelo Ca*** $^{2+}$ ***intracelular***	43

3.8.	***Diabetes Mellitus***	44
3.9.	***Lesões corneanas***	44
3.9.1.	*Colírio de Capsaicina 1µM*	44
3.9.2.	*Colírio BAC 0,2%*	44
3.9.3.	*Queimadura alcalina*	44
3.10.	***Teste do fenol vermelho***	45
3.11.	***Avaliação da córnea***	45
3.12.	***Coleta dos tecidos***	45
3.13.	***Coloração com hematoxilina de Harris e eosina (H&E)***	45
3.14.	***Imunofluorescência***	46
3.15.	***Ensaio quantitativo de PCR em tempo real para IL-1β, IL-6, TNFα e TRPV1***	46
3.16.	***Análises estatísticas***	47
4.	**RESULTADOS**	49
4.1.	***Cultura de células epiteliais da córnea e resposta a estímulos ao TRPV1 e CB1***	49
4.2.	***Papel do TRPV1 em córnea e GL de ratos com DM***	52
4.3.	***Papel do TRPV1 em córnea e GL de ratos tratados com colírio BAC 0,2%***	54
4.4.	***A superfície ocular e resposta à agressão à córnea nos camundongos TRPV1 -/-***	54
5.	**DISCUSSÃO**	63
6.	**CONCLUSÃO**	67
6.4.	***Conclusões específicas***	67
7.	**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**	69
8.	**ANEXOS**	84

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Doenças da córnea estão entre as principais causas de cegueira e os mecanismos de lesão e reparação passam em grande parte pelo epitélio, porém os mediadores dessas ações são pouco conhecidos. Mudanças no meio externo próximo à córnea são identificadas pela ativação dos receptores de potencial transitório (TRPs) e isso desencadeia respostas inflamatórias e cicatriciais.

Estudos prévios indicam que o TRPV1 modula a liberação de mediadores inflamatórios, interage com o receptor canabinóide (CB1) e o receptor do fator de necrose tumoral-α (TNFαR) e essas interações regulam a resposta inflamatória frente a uma agressão ao epitélio da córnea (Pan, Yang et al. 2011).

Camundongos “knockout” para o TRPV1 foram descritos e tem sido usados em observações de neuropatias e resposta nocioceptiva (Caterina, Leffler et al. 2000). A relação do TRPV1 com doenças da córnea precisa ser melhor compreendida.

1.1. Epitélio da córnea

A córnea humana é composta de cinco camadas: epitélio corneano, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio (Figura1). Tem como principal função a proteção da superfície do olho contra agressões mecânicas e invasão microbiana e serve também para a absorção de nutrientes dissolvidos na lágrima, como o oxigênio e a glicose. Na córnea, o epitélio exerce uma função mais especializada, que é a óptica, ou seja, a de proporcionar uma interface lisa, homogênea e transparente com o ambiente externo, necessária à visão (Montes-Mico, Cervino et al. 2010). Embora as características das células epiteliais e da matriz extracelular subjacente variem conforme a região, (conjuntiva, o limbo ou a córnea), a mucosa ocular tende a reagir como um todo, em diversas enfermidades. Por isso, essas doenças foram agrupadas sob o nome de “doenças da superfície ocular”(Nelson 1982).

Perdas na transparência estão associadas com edema, desorganização das fibras estromais e subsequente opacificação. No entanto, sob condições fisiológicas normais, a espessura da córnea é mantida, apesar da contínua absorção de líquido. (Nelson 1982, Reinach and Pokorny 2008).

O epitélio da córnea desempenha papéis importantes na manutenção da função e integridade da córnea. Defeitos epiteliais corneais resultantes de uma lesão da córnea, tais como uma queimadura química podem ser curados de forma inadequada e levar a opacificação da córnea, neovascularização, infecção e perda visual (Reinach and Pokorny 2008).

A renovação das células epiteliais da córnea é essencial para a manutenção da transparência do tecido e acuidade visual. Esta função é necessária para a supressão da infiltração patogênica para o estroma, bem como a manutenção das propriedades ópticas da córnea. Este processo está sob controle autócrino e parácrino por uma série de citocinas e fatores de crescimento. Eles interagem com os seus receptores na camada basal para modular a proliferação e sincronizar os eventos associados à renovação epitelial (Yu, Yin et al. 2010).

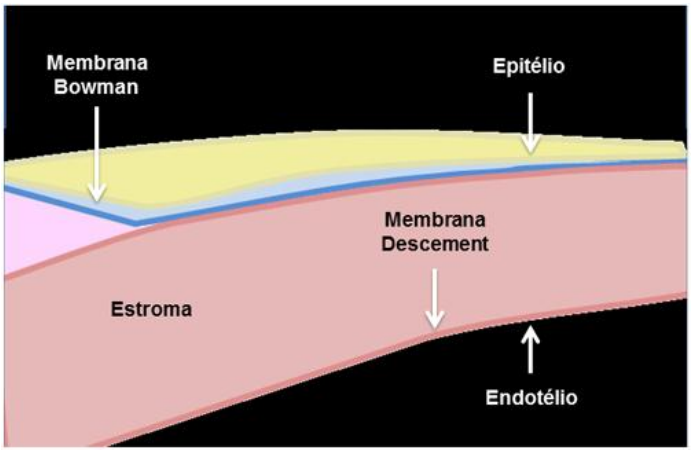

Figura 1 – As cinco camadas da córnea humana (adaptada de https://wendelteste.wordpress.com/2010/11/11/distrofia-de-fuchs/)

1.2. Superfície ocular

A superfície ocular (SO) compreende anatomicamente a mucosa margeada pelas bordas palpebrais, estendo-se da conjuntiva tarsal a superfície anterior do bulbo ocular, composta pela conjuntiva bulbar, limbo e córnea (Nelson 1982). Histologicamente, a superfície ocular é composta por epitélio estratificado não queratinizado da conjuntiva e da córnea. Essas células encontram-se firmemente

aderidas umas às outras, apresentam distribuição uniforme e características próprias e do tecido de sustentação subjacente que variam conforme cada região (Tseng and Tsubota 1997, Faria e Souza, Romano et al. 2006).

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

1.3. Glândula lacrimal

A glândula lacrimal (GL) é histologicamente formada por células acinares em forma de pirâmide, com o ápice direcionado para o centro do lúmen e com sua porção basal separada da membrana basal por células mioepiteliais, que atuam como células contráteis participando do processo de secreção. O espaço entre os ácinos é preenchido por tecido conjuntivo que contém numerosos vasos sanguíneos, nervos não mielinizados e leucócitos.

A lágrima contém diversos agentes atuando na vigilância imunológica da superfície ocular tais como, imunoglobulinas, lactoferrinas, lisozimas e fatores de crescimento responsáveis por estímulos de diferenciação e crescimento celular imprescindíveis à renovação epitelial e ao reparo de lesões oculares. As principais funções da GL são a síntese e a secreção de proteínas para o filme lacrimal que protege e lubrifica a SO. O fluido lacrimal avalia os tecidos da superfície ocular, inflamação e funções da GL além de doenças como olho seco (Sullivan, Rocha et al. 1998, Zhou, Zhao et al. 2012).

As GLs podem ser acometidas por doenças degenerativas que levam a uma progressiva perda funcional, com consequente manifestação de olho seco e alterações da SO. Tais doenças degenerativas podem ser decorrentes de uma adenite autoimune como a presente na Síndrome de Sjögren (Sullivan and Edwards 1997, Toda, Sullivan et al. 1999), por alterações de caráter indeterminado presentes em doenças crônicas como DM (Ramos-Remus, Suarez-Almazor et al. 1994, Seifart and Strempel 1994,

Goebbels 2000), ou ainda nos processos fisiológicos relacionados ao envelhecimento (Bromberg and Welch 1985, Schein, Munoz et al. 1997, Schein, Tielsch et al. 1997, Zoukhri 2006). Esses figuram como os principais mecanismos de acometimento das GLs.

1.4. Diabetes Mellitus

O Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença metabólica caracterizada por um aumento anormal de glicose no sangue, que afeta cerca de 12% da população no Brasil (aproximadamente 22 milhões de pessoas). Atualmente, mais de 250 milhões de pessoas convivem com a doença, mas esse número deve chegar a 300 milhões, em 2025.

O DM é classificado como DM tipo 1 no qual ocorre destruição das células β das ilhotas pancreáticas, usualmente levando à deficiência completa de insulina, já que sua produção ocorre nesse órgão, podendo ser autoimune ou idiopática. DM tipo 2: onde ocorrem graus variados de diminuição de secreção e resistência à insulina.

Existem outros tipos baseados em causas menos comuns, relacionados com a função da célula β**,** defeitos genéticos da ação da insulina**,** doenças do pâncreas exócrino**,** endocrinopatias, indução por drogas ou produtos químicos, infecções, formas incomuns de diabetes e diabetes gestacional (American Diabetes 2015).

Em ambos os tipos 1 e 2 os fatores genéticos são importantes, correspondendo a 20-30% dos casos de DM tipo 1 e de 5-10% dos casos de DM tipo 2. Geralmente essa predisposição genética resulta em disfunção do pâncreas na produção de insulina. Pode ter origem tanto monogênica (um único gene defeituoso em áreas centrais da produção de insulina) quanto poligênica (vários genes em áreas secundárias) (Reis and Velho 2002, Fernandes, Pace et al. 2005).

O pâncreas é o órgão responsável pela produção do hormônio denominado insulina, o qual regula a glicemia. Para que as células das diversas partes do corpo humano possam realizar o processo de respiração aeróbica é necessário que a glicose esteja presente nas células. As células possuem receptores de insulina (tirosina quinase) que quando acionados abrem a membrana celular para a entrada da glicose

presente na circulação sanguínea. Uma falha na produção de insulina resulta em altos níveis de glicose no sangue, pois a glicose não é dirigida ao interior das células.

A insulina é liberada no sangue pelas células β pancreáticas em resposta aos níveis crescentes de glicose no sangue. A insulina é também o sinal de controle principal para a conversão da glicose em glicogênio para armazenamento interno nas células do fígado e musculares. Quando os altos níveis de glicose permanecem por longos períodos a glicose causa danos ao sistema circulatório inclusive da retina, levando a dificuldades de visão conhecidas como retinopatia diabética. A visão embaçada é a queixa mais comum que leva ao diagnóstico de diabetes; o DM tipo 1 deve ser suspeito em casos de mudanças rápidas na visão e DM tipo 2 geralmente causa uma mudança mais gradual.

A formação e acúmulo de AGEs (“advanced glycation end products”) em suas diversas vias moleculares e as alterações estruturais e funcionais desencadeadas pelos processos de estresse oxidativo e ativação de mediadores inflamatórios têm sido relatadas e avaliadas em diversos estudos e ensaios clínicos (Brownlee, Cerami et al. 1988, Baynes 1991, Brownlee 2001).

O DM prejudica a secreção lacrimal e induz mudanças na GL e SO como observado em estudos experimentais e clínicos (Goebbels 2000, Alves, Calegari et al. 2005, Wakuta, Morishige et al. 2007).

A córnea diabética sofre disfunção celular e mecanismos de reparação disfuncional, que incluem erosões recorrentes, cicatrização de feridas, úlceras e edemas. Relacionada com a disfunção epitelial, pode ocorrer alterações na membrana basal (Midena, Brugin et al. 2006).

A retinopatia diabética (RD) é a causa mais comum de cegueira em pessoas acima de 50 anos de idade e há evidências de que seja uma doença inflamatória. A neuropatia diabética é um problema global que afeta aproximadamente 50% dos 26 milhões de americanos e mais de 366 milhões de pessoas no mundo com diabetes. Ela é a complicação mais comum da diabetes, levando a neuropatia dolorosa (~ 21%) (Abbott, Malik et al. 2011) e um aumento de 23,3 vezes do risco relativo de úlceras nos pés e amputação (Holman, Young et al. 2012). Na córnea, ocorre perda da

sensibilidade e inervação (Zhivov, Winter et al. 2013) o que pode estar relacionado com defeitos epiteliais da córnea.

As alterações na córnea também ocorrem na área do limbo, onde existem células germinativas epiteliais da córnea na junção córneo-escleral que são a fonte de novas células para o epitélio central da córnea.

A hiperglicemia tem profundos efeitos sobre o olho. Na córnea, causa ceratopatia diabética, e na retina e coróide, pode matar células vasculares e neuronais. Uma vez que o olho foi exposto a hiperglicemia a longo prazo, membranas basais acumulam produtos avançados-finais de glicosilação tóxicos e morte celular (Lutty 2013).

1.5. Receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1)

Os TRPV1 são canais de sensores celulares envolvidos na formação da visão, audição, tato, olfato, paladar, temperatura e sensação de dor. Estas funções se dão através da ativação de vias de sinalização celular e permite que a célula responda a alterações ambientais benignas ou nocivas (O'Neil and Heller 2005, Plant and Strotmann 2007, Wu, Gao et al. 2007).

Um outro tipo de ativação de TRP ocorre através de ligantes específicos. Inicialmente, tanto compostos orgânicos sintéticos exógenos ou produtos naturais poderiam ativar TRP. Apesar do TRPV1 ser designado como receptor de capsaicina, estudos subsequentes revelaram que também interage com outras isoformas de TRP. Embora o mecanismo de ativação do canal de TRP ainda não esteja claro, o limite de ativação é reduzido pelo influxo Ca^{2+} e mensageiros secundários de ácidos graxos para permitir a abertura do canal que conduz à despolarização da membrana (Ufret-Vincenty, Klein et al. 2015).

A capacidade de sentir as temperaturas ambientais e para evitar o calor ou frio é crucial para a sobrevivência de todos os organismos (Voets 2012). O TRPV1 é ativado a 43 °C (Tominaga and Caterina 2004).

Outra função importante do TRPV1 é que a sua ativação por capsaicina induz aumentos na proliferação e migração celular através da ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR trans) (Yang, Wang et al. 2010). Este efeito

estimulador de TRPV1 na promoção da proliferação e migração celular está associado com aumentos nos níveis de IL-6 (interleucina-6) e expressão da substância P, os quais são co-ativadores de fator de crescimento induzindo a cicatrização de feridas (Sumioka, Okada et al. 2014).

Estudos *in vivo* para identificar os mediadores bioquímicos que sinalizam o trauma ou lesão para a célula mostraram que uma determinada lesão induz a formação de numerosos metabólitos que são conhecidos como ativadores de receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) e de outros receptores também expressos na córnea, como os receptores canabinóides (CB1) e de TNFα (Saika 2007, Di Marzo and De Petrocellis 2010).

Esses receptores são ativados por agentes ambientais, como patógenos, produtos de degradação de tecidos, aumento da temperatura, pH<6 e estresse hiperosmótico, que levando à formação de endovanilóides e endocanabinóides, atuam como agonistas de TRPV1 e de CB1 (Zhang, Yang et al. 2007, Yang, Wang et al. 2010). Agonistas seletivos foram identificados e são usados para determinar *in vitro* a resposta na sinalização intracelular à ativação desses receptores. Estes agonistas seletivos incluem: WIN55 212-2 para o CB1, a capsaicina para o TRPV1 ou o TNF-α para o TNFαR (Jeske, Patwardhan et al. 2006, Zhang, Yang et al. 2007, Yang, Wang et al. 2010).

1.5.1. Capsaicina

A capsaicina (8-metil-N-6-vanilil-nonenamida) é o principal constituinte da planta nativa americana *Capsicum sp*, conhecida como “hot chili pepper”, foi primeiro isolado e denominado por Thresh em 1846(Szallasi and Blumberg 1990). Estudos demostraram que a capsaicina poderia induzir uma sensação de dor ardente (Bernstein, Swift et al. 1981, Stjarne, Lundblad et al. 1989) e hiperalgesia na pele (Bartho, Stein et al. 1990, Baumann, Simone et al. 1991). Estes efeitos resultam da estimulação e a despolarização dos neurônios sensoriais aferentes primários (Holzer 1991), seguida pela liberação de mediadores pró-inflamatórios (Southall, Li et al. 2003). Após administração repetida, estas respostas induzidas por capsaicina mostram uma rápida dessensibilização (Hayes, Hawcock et al. 1984, Green 1989, Dray 1992).

Estudos bioquímicos e eletrofisiológicos indicaram que a capsaicina facilita a excitabilidade e condução elétrica em fibras C sensoriais não mielinizadas e corpos celulares neuronais, aumentando a permeabilidade de sódio e de cálcio (Erdelyi, Such et al. 1987, Marsh, Stansfeld et al. 1987, Wood, Winter et al. 1988). Além disso, foi inicialmente observado que a capsaicina pode também ligar-se a locais específicos nos terminais periféricos de fibras mielinizadas finas (Matsumiya, Sawa et al. 1983, Chung, Lee et al. 1985, Hiura and Sakamoto 1987, Szolcsanyi, Anton et al. 1988). Este subconjunto de neurônios bipolares está envolvido no desenvolvimento de dor crônica. Os corpos celulares estão localizados no gânglio da raiz dorsal (DRG) e do gânglio do trigêmeo, a partir de onde eles enviam terminais que formam sinapses com os neurônios de segunda ordem no sistema nervoso central (SNC) (Williams and Zieglgansberger 1982, Chad, Rasool et al. 1983, Holzer 1991, Szallasi 1995).

1.5.2. Capsazepina

Os efeitos da capsaicina são antagonizados de forma competitiva por uma droga chamada capsazepina (Walpole, Bevan et al. 1994). Este antagonista foi identificado em estudos de auto radiografia por afinidade pelo receptor, utilizando [3H] resiniferatoxina (RTX), um potente análogo de capsaicina, em tecidos de várias espécies, incluindo humanos (Szallasi and Blumberg 1990, Szallasi and Blumberg 1990, Acs, Palkovits et al. 1994, Szallasi 1994). Capsaicina e RTX compartilham um grupo vanilil como o local de reconhecimento estrutural denominado vanilóide (Szallasi and Blumberg 1990). Em 1997, o receptor vanilóide foi clonado em células de ratos a partir do gânglio da raiz dorsal (DRG) e demonstrou ser um subtipo de canais catiônicos não seletivos relacionados com o receptor de potencial transitório (TRP) da família de canais de íons (Caterina, Schumacher et al. 1997). Este receptor foi nomeado como "subtipo” receptor vanilóide 1 (VR1). Mais tarde foi renomeado pelo Comitê de Nomenclatura da IUPHAR o "Receptor potencial transitório vanilóide 1” (TRPV1) (Clapham, Julius et al. 2005).

1.5.3. Canais de cálcio

Os receptores de potencial transitório (TRP) são uma superfamília de proteínas de membrana que é subdividida em sete grupos de acordo com diferenças na sequência de aminoácidos (Pan, Yang et al. 2011).

Tais mudanças em diferentes subtipos de TRP são extraídas para a maior parte através de aumentos transitórios do influxo de Ca^{2+} intracelular como consequência da ativação do canal. A magnitude e duração do afluxo de Ca^{2+} modulam as respostas de sinalização que induzem uma resposta homeostática ou letal. Portanto, identificar quais os subtipos de TRP respondem às pressões fisiológicas e patogênicas impostas sobre o tecido da córnea, pode auxiliar na identificação de medicamentos alvos novos.

Esta abordagem pode então ser utilizada para identificar drogas com subtipos específicos ou técnicas genéticas para reverter as perdas da função corneana que são causados por má adaptação TRP. Neste ponto, é cada vez mais evidente que a termo-TRP desempenha um papel importante na indução de tal controle (Okada, Reinach et al. 2011, Sumioka, Okada et al. 2014).

Apesar de existirem algumas indicações relevantes de papéis de termo-TRP em células da córnea, há poucas informações sobre os mecanismos celulares que modulam a ativação e desativação do canal TRP em tecidos da córnea e células. Essa percepção levou esforços para preencher essa lacuna de conhecimento, o que é necessário para desenvolver drogas ou controle de expressão de genes que possam modular seletivamente o comportamento TRP sem ter efeitos secundários.

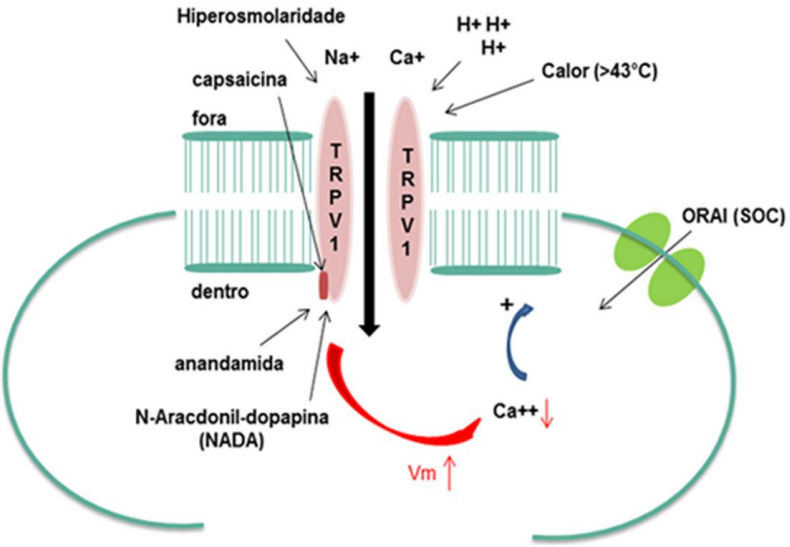

Figura 2 – Representação esquemática de TRPV1 (receptor de capsaicina). O TRPV1 modula forças motrizes para a entrada de Ca^{2+}. É um canal iônico e um receptor polimodal para vários metabólitos estímulos inflamatórios, hipertonia, prótons, de calor e de lipídios. TRPV1 possui ativadores endógenos, como endocanabinóides (anandamida, NADA). TRPV1 também pode ser ativado por calor (> 43 ° C) e é permeável para monovalentes e divalentes como outros canais catiônicos não específicos. Notavelmente, a despolarização da membrana (Vm ↑) por canais TRPV1 resulta em uma entrada de Ca^{2+} via ORAI. (adaptada de (Mergler, Valtink et al. 2014))

O TRP são capazes de modular as forças motrizes para a entrada de Ca^{2+}.A despolarização da membrana por PG resulta numa entrada de Ca^{2+} da Orai reduzida.

1.6. Mediadores inflamatórios

As citocinas são mediadores da resposta inflamatória em infecções e lesões, favorecendo a defesa e a cicatrização de feridas. Diferentes tipos de células secretam as mesmas citocinas, e cada citocina pode agir em diversos tipos de células. Este fenômeno recebe o nome de pleiotropia. As citocinas influenciam a atividade, diferenciação, proliferação e atração das células inflamatórias podendo aumentar a atividade de outras citocinas (pró – inflamatórias) ou atenuar a resposta inflamatória.

O TNFα (fator de necrose turmoral alfa) é o protótipo da citocina pró-inflamatória pela capacidade de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas (Gordon, Lagan et al. 2004). O TNFα pode ser liberado por diversas células, e exercer seus efeitos

através da interação com o receptor do TNF tipo I (sTNRF1), que tem sua expressão aumentada após a lesão celular (Schafers, Svensson et al. 2003).

O TNFα existe em duas formas: uma transmembrana de 26kDa e outra secretada de 17kDa, ambas biologicamente ativas. É estruturalmente relacionado à linfotoxina-α (LTα, também chamada TNF-β), tendo os mesmos receptores, TNFR1 (55 kDa) e TNFR2 (75 kDa). O TNFR1 é expresso em neurônios e está associado à maioria dos efeitos biológicos do TNFα, incluindo respostas inflamatórias e apoptose. Já o TNFR2 é expresso principalmente em macrófagos e monócitos no gânglio da raiz dorsal, estimulando a proliferação de linfócitos-T, fibroblastos e células matadoras naturais (Lin, Calvano et al. 2000, Zhang and An 2007).

De outro modo, a IL-1β (interleucina 1β) interage com o receptor para IL-1 β tipo I (IL1RI), ativando a proteína quinase C (PKC) específica. Há também, expressão desses receptores no gânglio da raiz dorsal, sugerindo a ação autócrina e parácrina da IL-1β no processo sensorial (Sommer and Kress 2004). É possível que a IL-1β iniba a habilidade das células glia em remover o glutamato da fenda sináptica, contribuindo para alta excitabilidade neuronal.

Em doenças que cursam com processo inflamatório agudo ou crônico, é possível que as citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα) induzam o organismo a criar uma série de respostas caracterizadas por febre, aumento do sono e da síntese de proteínas pelo fígado, redução da ingestão de água e de alimentos, aumento da liberação de corticosteróides, alteração da atividade cerebral das monoaminas, diminuição da atividade do cotidiano e da interatividade social e hiperalgesia (Watkins, Maier et al. 1995). A IL-1β produz inflamação sistêmica através da ativação da ciclooxigenase-2, com a formação de PGE2 no hipotálamo anterior, causando febre. Tem importante função no desenvolvimento e na manutenção da dor pós-operatória (Zhang and An 2007, Wolf, Livshits et al. 2008).

A IL-6 é uma glicoproteína de 22 a 27 KDa, secretada por muitos tipos de células, como macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos e da glia, sendo TNFα e IL-1β potentes indutores daquela. Ela é uma mediadora de febre e ativa o eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal, usando os receptores α (IL-6Rα) e a subunidade gp130 (glicoproteína 130, membros da superfamília de receptor de citocina de classe I). Tem

relação estrutural com IL-4, fator inibidor de leucemia, eritropoietina e fator neurotrófico ciliar (Curfs, Meis et al. 1997).

Essa interleucina é um dos mais precoces e importantes mediadores de indução e controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante estímulos dolorosos, como trauma, infecção, operação e queimadura. Após lesão, concentrações plasmáticas de IL-6 são detectáveis em 60 minutos, com pico entre 4 e 6 horas, podendo persistir por 10 dias. É considerado o marcador mais relevante do grau de lesão tecidual durante um procedimento cirúrgico, em que o aumento excessivo e prolongado está associado a uma morbidade pós-operatória maior (Gebhard, Pfetsch et al. 2000, Lin, Calvano et al. 2000).

1.7. Receptor Canabinóide 1 (CB1)

Canais de TRPV1 e subtipo de receptor canabinóide 1 (CB1) são dois alvos de drogas potenciais para reduzir a inflamação da córnea e também a perda de transparência provocada por lesão. A ativação de CB1 também poderia aumentar a indução de TRPV1 na liberação de IL-8. Estratégias para bloquear a ativação induzida por lesão de TRPV1 ou promover ativação de CB1 pode fornecer novas abordagens para melhorar a cicatrização de feridas da córnea (Zhang, Yang et al. 2007, Mergler, Valtink et al. 2010, Pan, Wang et al. 2011).

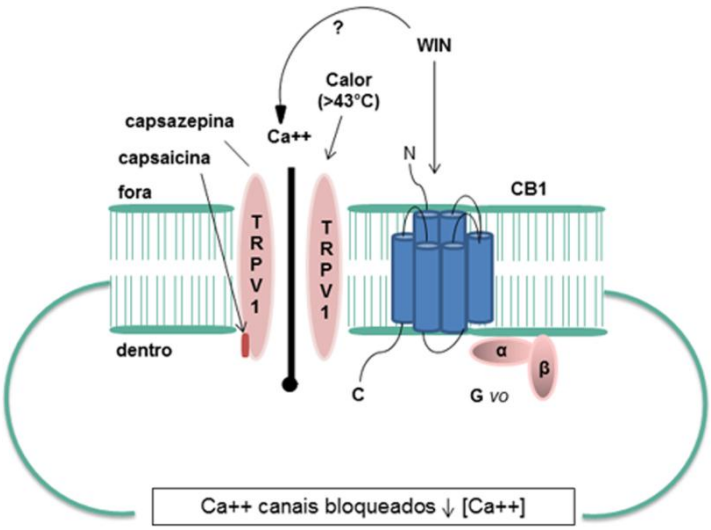

Figura 3 – Via de transdução de sinal Ca^{2+} ativadas pelo agonista de CB1. O TRPV1 pode ser seletivamente ativado por capsaicina (> 43 °C) ou bloqueados por capsazepina. O receptor CB1 acoplado a proteínas Gi,pode ser ativado por WIN. O TRPV1 ativado pela capsaicina, bloqueia WIN, que leva a uma redução do Ca^{2+} intracelular (↓ [Ca^{2+}]. Provavelmente, WIN também pode ativar diretamente TRPV1 por um mecanismo independente de CB1. (adaptada de (Mergler, Valtink et al. 2014)).

1.7.1. Win 55,212-2

O Win 55,212-2 é um produto químico descrito como um derivado “aminoalkylindole” (AAI), e que produz efeitos semelhantes aos de canabinóides, tais como tetra-hidrocanabinol (THC), mas tem uma estrutura química inteiramente diferente (Compton, Gold et al. 1992, Ferraro, Tomasini et al. 2001, Zhang, Ma et al. 2002).

O Win é um potente agonista do receptor de canabinóides (Felder, Joyce et al. 1995), sendo um potente analgésico (Meng, Manning et al. 1998), em modelos de ratos de dor neuropática.(Herzberg, Eliav et al. 1997). Ele ativa a p42 e a p44 MAP quinases da via de sinalização mediada por receptores (Bouaboula, Poinot-Chazel et al. 1995).

1.8. Lesão corneana por NaOH e BAC

A córnea é um tecido avascular transparente localizado na parte mais exterior do olho. Ela deve continuar a ser transparente para refratar a luz corretamente para a visão normal, após regenerar de uma agressão. O trauma ocular resultante de uma queimadura alcalina da córnea é um grave problema clínico e pode causar perda visual permanente através da inflamação do tecido, fibrose, e formação de cicatrizes, e subsequente opacificação (Brodovsky, McCarty et al. 2000).

A sequência da lesão da córnea após queimadura alcalina inclui inflamação e degradação da matriz da membrana basal epitelial, estromal (Ishizaki, Zhu et al. 1993, Saika, Uenoyama et al. 1993) e células inflamatórias. A ativação de fibroblastos córneos (ceratócitos), formação de miofibroblastos, e cicatrização de tecidos estão envolvidos na resposta de cicatrização de feridas em córnea com queimadura alcalina (Ishizaki, Zhu et al. 1993, Saika, Kobata et al. 1993).

Nervos sensoriais da córnea têm origem no gânglio trigêmeo (GT) e através do primeiro ramo do nervo trigêmeo (oftálmico) e um número limitado de células trigeminais (até 450) (Morgan, Nadelhaft et al. 1978, LaVail, Johnson et al. 1993) dão origem a até 630.000 nociceptores da córnea. (Marfurt, Kingsley et al. 1989).

O fato de o GT ser afetado pela inflamação da córnea pode ter implicações clínicas significativas, uma vez que os nervos da córnea podem transmitir e perpetuar as repercussões da agressão no SNC (Ferrari, Bignami et al. 2014).

Lesões envolvendo essas estruturas não são bem compreendidas e estão associadas a córnea neuropática e opacidade de córnea. Esse tipo de lesão tem como consequência uma das principais causas de cegueira no mundo, a cegueira corneana, afetando 55 milhões de pessoas a cada ano e deixando 19 milhões de deficientes visuais (Whitcher, Srinivasan et al. 2001).

Assim, as doenças da superfície ocular altamente prevalentes, como ceratite infecciosa e olho seco, podem estar tendo repercussões nos nervos periféricos. Além disso, a crescente popularidade dos procedimentos cirúrgicos envolvendo as camadas superficiais da córnea, onde os nervos estão localizados, faz com que a lesão do nervo seja ainda mais frequente como, por exemplo, na cirurgia refrativa.

O cloreto de benzalcônio (BAC) é o conservante mais comumente usado em gotas para os olhos e é conhecida pelos seus efeitos tóxicos e pró-apoptóticos sobre a superfície ocular (Debbasch, Brignole et al. 2001, Pauly, Meloni et al. 2009). É um amônio quaternário que possui propriedades tensoativas que podem desestabilizar a camada lipídica da película lacrimal, aumentando assim a evaporação da lágrima e provocando a instabilidade do filme lacrimal (Baudouin 1996), além de destruir células caliciformes e desempenhar um papel no desenvolvimento do olho seco (Rolando, Terragna et al. 1990, Kahook and Noecker 2008). Além disso, BAC é suspeito de ser um fator importante que causa olho seco em pacientes com glaucoma tratados durante longo prazo (Leung, Medeiros et al. 2008, Labbe, Terry et al. 2012), um conceito que é agora claramente apoiado pela utilização de BAC como um indutor de olho seco em modelos experimentais. Estes resultados demonstram diretamente as interações entre a película lacrimal, a superfície ocular e BAC, através de possíveis interações com o estresse hiperosmótico e condições inflamatórias.

A fim de conhecer maneiras de modular a inflamação que ocorre durante a cicatrização de feridas na córnea, nossos esforços foram focados em determinar o papel do TRPV1 na inflamação induzida sobre o epitélio *in vitro* e em modelos animais.

Nosso estudo foi concentrado nas observações da expressão desses mediadores, declínio ou aumento frente a agressões, expressão de citocinas e alterações comportamentais e histológicas (Pan, Wang et al. 2011).

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi identificar os mecanismos de sinalização relacionados ao TRPV1 na resposta inflamatória e proliferativa em células epiteliais da córnea.

2.1. Objetivos Específicos

1. Avaliar a expressão dos receptores CB1, TRPV1 em cultura primária de epitélio da córnea e a resposta inflamatória e proliferativa aos seus agonistas.
2. Determinar se a toxicidade por BAC a 0,2% ou o DM alteram a expressão do RNAm do TRPV1 e das citocinas IL -1β, IL-6 e TNFα em córnea de ratos.
3. Observar os aspectos da superfície ocular de camundongos TRPV1-/- em condições basais e seguindo estímulos nocioceptivos com CAP a 1µM, BAC a 0,2 % e NaOH a 1M.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Modelo Animal

Para este estudo foram utilizados 35 ratos *Wistar* machos, pesando entre 200 a 300 gramas e 60 camundongos, pesando entre 16 a 22 gramas fornecidos pelo Biotério Central do *Campus* da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram acondicionados em caixas adequedas, com ração e água *ad libitum*.

Todos os protocolos de estudo seguiram os princípios de cuidados com animais de laboratório (NIH publicação n° 85-23) e as diretrizes da *Association of Research in Vision and Ophthalmology* - ARVO e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo n° 038/2013) (Anexo 1).

3.1.1 Desenho e Grupos de Estudo

O desenho do estudo resume as etapas cumpridas (Figura 4). A seguir uma tabela que mostra os grupos dos animais em estudo, linhagem, sexo, tipo de lesão e número de animais utilizados nos experimentos (Tabela 1).

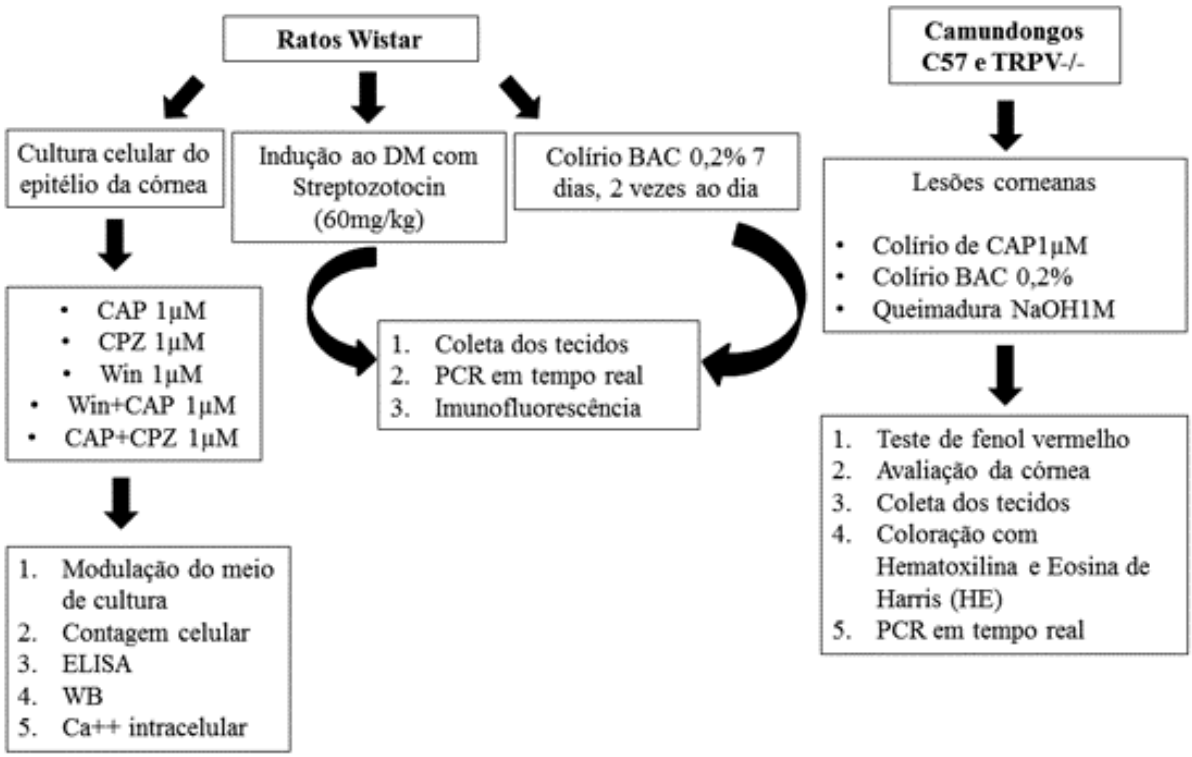

Figura 4 – Desenho do estudo: análises realizadas para cada grupo de animais.

Tabela 1 – Grupos de animais em estudo.

Animais	Sexo	Grupos	n
A – Ratos*Wistar*	Macho	Controle	20
B – Ratos *Wistar*	Macho	DM	10
C – Ratos *Wistar*	Macho	BAC 0,2%	5
D – Camundongos TRPV1-/- e C57	Macho e Fêmea	Controle	20
E – Camundongos TRPV1-/- e C57	Macho	CAP1µM	10
F – Camundongos TRPV1-/- e C57	Macho e Fêmea	BAC 0,2%	20
G – Camundongos TRPV1-/- e C57	Macho	NaOH1M	10

3.2. Cultura de células epiteliais da córnea

A córnea de ratos *Wistar* foram coletadas após eutanásia com dose letal de quetamina (0,15mL/kg) e xilazina (0,15mL/kg), colocadas em placas de Petri com 3,0 ml de solução balanceada *Hanks-HBSS* (GIBCO®**,** *Invitrogen* Co., CA, EUA) e sob condições de assepsia, utilizando o microscópio, as córneas foram fragmentadas com pinça e tesoura cirúrgicas delicadas e estéreis para retirada do endotélio, da *Descemet*, do estroma e das regiões centrais das córneas. A região periférica da córnea foi cortada em quatro partes, lavadas com 1,0 ml de *Hanks-HBSS* e inseridas com a face voltada para baixo nos poços de cultura (placa de 24 poços) com o meio de cultura em pH 7,4 (DMEM-F12 , gentamicina 50 µg/ml, antibiotic-antimycotic (100X) 1.25 µg/ml (Invitrogen – GIBCO, BRL, Grand Island, NY, USA), soro fetal bovino (SFB) 10% (Sigma-Aldrich Co., Mo, EUA), insulina humana 5µg/ml, DMSO 0.5%, hidrocortisona 0.5µg/ml, fator de crescimento epidermal recombinante humano (hrEGF) e toxina da cólera subunidade A 30ng/ml (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) incubadas em estufa a 37ºC com 5% de CO2. A troca do meio de cultura foi feita a cada dois dias e após cinco dias os tecidos foram removidos e a cultura foi analisada com microscópio invertido, para a observação da proliferação das células epitelias até que fosse obtido um número satisfatório de células para a realização da modulação do meio de cultura com os agentes propostos.

3.3. Modulação do meio de cultura

Uma vez estabelecida a cultura, as placas com amostras confluentes de células epiteliais de córnea foram expostas a 1µM de agentes agonistas, tais como: Win55,212-2 (Cayman Chemical, Michigan, USA), capsaicina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e a 1µM de agente antagonista, tais como, a capsazepina (Cayman Chemical, Michigan, USA), com o intuito de induzirem a inflamação bloqueando ou não os receptores TRPV1, CB1 ou TNFαR.

Após 1 hora, as amostras do meio de cultura e as células epiteliais da córnea foram coletadas para a realização dos experimentos.

3.4. Contagem Celular

Após 1 hora de exposição com os agentes estudados, o meio de cultura foi removido e as placas foram lavadas e tripsinizadas com 300 µl de *Trypsin-EDTA* 0,5% (Invitrogen – GIBCO, BRL, Grand Island, NY, USA). Após 5 minutos de incubação e a confirmação de que todas as células foram desprendidas dos poços, adicionou-se 300 µl de meio de cultura e este conteúdo foi transferido para tubos eppendorfs, sendo centrifugados por 5 minutos a 1000 rpm a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuspenso com 1ml de meio. Misturou-se 10µL da suspensão de células com 10 µL da solução de *Trypan Blue Solution* 0.4% (Invitrogen - GIBCO, BRL, Grand Island, NY, USA), constituindo uma solução de 1:1 (com fator de diluição 1). Após homogeneizar, foi transferido 10µl desta solução para a câmera específica para leitura, no contador de células. A quantificação de células coradas ou não com o azul de tripan foi então realizada, utilizando-se o protocolo específico do contador de células *Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen Corporation, CA, EUA)*.

3.5. ELISA

Com a finalidade de investigar se a ativação isolada e/ou conjunta dos receptores mencionados teve repercussão na produção e/ou liberação das citocinas pró-inflamatórias e quimiotáxicas, após 1 hora, amostras do meio de cultura do epitélio da córnea que foram expostas aos estímulos agonista dos receptores TRPV1 e CB1foram submetidas à técnica de ELISA, utilizando os kits comerciais da Thermo Scientific (Carlsbad, CA, USA) para dosagens de TNFα e IL-1β. A leitura foi realizada através da espectrofotometria de luz, no aparelho SpectraMax M3 (Molecular Devices; Sunnyvale, CA; USA), utilizando uma curva padrão de acordo com orientações do fabricante do kit.

3.6. Western blotting

Para obter a extração total de proteína, as amostras de células epiteliais da córnea foram solubilizadas com 50µl de tampão RIPA contendo: Tris (50mM), NaCl (150mM), EDTA (1,27mM), detergentes Triton X-100 (1%), deoxicolato de sódio (0,5%), SDS (0,1%) e Halt™ Protease & Phosphatase Single-Use Inhibitor Cocktail (100x) (Thermo

Scientific, USA), e homogeneizadas usando o Polytron PT 1200E (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). Os extratos foram centrifugados a 14.000 rpm, a 4°C por 30 min para remover o material insolúvel.

A concentração total de proteínas foi dosada pelo método de Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA).

Posteriormente, amostras contendo 10µl de extrato de proteínas foram tratadas com tampão Laemmli aquecido e submetidas a eletroforese, usando gel de acrilamida/bisacrilamida Mini-PROTEAN TGX ™ Gels (Bio-Rad, United States) de 4 a 15% para a separação das proteínas (60 µg proteína/poço).

As proteínas presentes no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose Trans-Blot Turbo Transfer Pack (Bio-Rad Philadelphia, PA USA) através do aparelho de Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad Philadelphia, PA USA) por tempo e amperagem específicos de acordo com o tamanho da proteína.

As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com albumina de soro bovino (BSA) 5% em TBS-T (10 mM Tris HCl [pH 7,4], 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) por 1 hora e incubadas com anticorpos primários, *overnight* a 4°C. (Tabela 4).

No dia seguinte, as membranas foram lavadas com tampão TBS-T e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário conjugado com HRP. Foi utilizada uma proteína de referência como controle endógeno GAPDH (Cell Signaling) para a normalização da expressão. A expressão das proteínas foi detectada por quimioluminescência Kit ECL *Prime Western blotting Detection Reagente* (GE Healthcare, UK), sendo o sinal captado pela câmera do equipamento Image Quant LAS4000 (GE, UK).

A intensidade das bandas foi quantificada pelo Software Image Studio Lite Version 3.1.4 (Lincoln, Nebraska, EUA).

Tabela 2 – Anticorpos utilizados nas técnicas de *Western blotting* e imunofluorescência para cultura celular da córnea de ratos.

Anticorpos	Fabricante	Nº. Cat	Peso Molecular (KDa)	Isotipo	Concentração	Diluição
Anti - TRPV1	Santa Cruz	SC 12498	100	Goat Polyclonal	200µg/ml	1:500
Anti - TRPV1	Novus Biologicals	NBP1-97417	100	Rabbit Polyclonal	1,30mg/ml	1:40
Anti - CB1	Abcam	Ab-3558	60	Rabbit Polyclonal	1mg/ml	1:250
Anti – cytokeratin	Abcam	Ab-27988	47	Mouse Monoclonal	80µg/ml	1:500
β – actina	Cell Signaling	4970	45	Rabbit Polyclonal	100µg/ml	1:250
Anti – GAPDH	Cell Signaling	2118S	37	Rabbit Monoclonal	100µg/ml	1:10000

3.7. Ativação do TRPV1 monitorado pelo Ca^{2+} intracelular

As células epiteliais da córnea foram plaqueadas, em um total de $2{,}0x10^5$/ml,em placas de cultura de 96 poços com borda preta. A solução do corante Fura 4F-AM a 4µM (Molecular Probes) foi incubada com as células por 45 min, em estufa a 37ºC, 5 % CO2, seguida de 3 lavagens com PBS 1M gelado e em seguida foi adicionado meio de cultura DMEM sem fenol (Invitrogen – GIBCO, BRL, Grand Island, NY, USA) e esta placa lida no aparelho FlexStation - Citômetro de Fluxo para analisar o influxo de cálcio intracelular através da absorbância.

O registro das imagens e controle da fluorescência foi feita por programa de computador e os registros digitais das imagens obtidas nas diferentes condições experimentais, enquanto as células em cultura permanecem em perfusão de meio de cultura e a injeção o estímulo com CAP 1µM ocorre de maneira direta.

A ativação do TRPV1 e o consequente aumento no influxo de Ca^{2+} foram induzidos pela incubação com CAP a 1µM em placas de cultura de 96 poços com fundo

em U e após a obtenção de padrões com curvas de dose resposta a Capsaicina e disponibilidade de Ca^{2+} intracelular, mostrando a ativação de TRPV1.

3.8. Diabetes mellitus

Os animais do grupo B foram induzidos ao diabetes *mellitus* por Streptozotocina (60mg/kg) e após 3 dias, foi medida a glicemia para avaliar se os ratos estavam com a doença ou não, com o aparelho Accu Check Active (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Foram utilizados 10 animais sendo que houve perda de 2 por morte.

3.9. Lesões corneanas

As lesões corneanas se caracterizaram pela agressividade, sendo o colírio de capsaicina mais branda, depois tratamento com BAC moderada e a queimadura alcalina como a mais agressiva.

3.9.1. Colírio de Capsaicina 1µM

Os animais do grupo E receberam aplicação tópica de 50µL de colírio de capsaicina 1µM no olho direito e durante 1 min analisamos a quantidade de toque da pata no olho desses animais através de filmagem.

3.9.2. Colírio BAC 0,2%

Os animais dos grupos C e F foram tratados durante 7 dias, 2 vezes ao dia, com colírio BAC 0,2% no olho direito.

3.9.3. Queimadura alcalina

Os animais do grupo G receberam queimadura com NaOH a 1M no olho direito durante 30 seg, e após a queimadura foi instilado solução salina no mesmo olho durante 1 min.

Após 1 hora da aplicação do colírio de Capsaicina a 1µM, 7 dias de aplicação com o colírio BAC a 0,2% e 7 dias após a queimadura alcalina foram realizados os testes a seguir.

3.10. Teste do fenol vermelho

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

3.11. Avaliação da córnea

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

3.12. Coleta de tecidos

Foram colhidos os tecidos: gânglio trigêmeo (GT), glândula lacrimal (GL) e globo ocular (GO) para realização da coloração com hematoxilina de Harris e eosina (H&E), ensaios de imunofluorescência e PCR em tempo real.

3.13. Coloração com hematoxilina de Harris e eosina (H&E)

Os tecidos foram coletados e desitradatos em série crescente de etanol, diafinizados em xilol e embebidos em banhos de parafina à 60ºC para inclusão em blocos. Foram realizados cortes de 6 µm de espessura no micrótomo Leica Jung RM2065 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). Os cortes foram desparafinizados em xilol, rehidratados em série decrescente de etanol e lavados em água destilada. A seguir, foram corados com solução de Hematoxilina por 2 minutos, lavados em água corrente, imersos em Eosina por 2 minutos, e novamente lavados em água corrente. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em série crescente de

etanol, diafanizadas em xilol e montadas em Tissue Mount (Tissue Tek® Glas™ Mounting Media, Sakura, Finetek USA).

3.14. Imunofluorescência

Os tecido foram congelados em Tissue-Tek O.C.T. (Optimal Cutting Temperature) e utilizadas lâminas silanizadas com cortes congelados de 10 µm de espessura, colocados em solução de formoldeído 4% em PBS por 15 min. Incubado o anticorpo primário anti-TRPV1 (Novus Biologicals, NBP1-97417, USA) diluído 1:40 em PBS+BSA por 2 horas e após as lavagens com PBS, foi incubado o anticorpo secundário anti-rabbit por 1 hora. A montagem foi feita com ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI, (Life technologies). Conforme protocolo do laboratório.

3.15. Ensaio quantitativo de PCR em tempo real para TRPV1, CB1, IL-6, IL-1β e TNF-α.

A PCR em tempo real foi usada para identificar a expressão relativa do RNAm de TRPV1, CB1, TNFα, IL-6 e IL-1β (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (Tabela 2) nas glândulas lacrimais e córneas dos grupos de animais em estudo A, B, C e F (Tabela 3). Como controle endógeno usamos a β-actina (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para normalização interna.

O RNA total foi extraído utilizando o Kit Pure Link^{TM} RNA Mini kit (Ambion by Life Technologies, USA). Foi utilizado o Kit DNA-Free DNase Treatment & Removal (Ambion by Life technologies, USA) para retirar contaminação de DNA genômico.

As amostras contendo 250ng de RNA total foram utilizadas para síntese de cDNA com High Capacity – cDNA Reverse Transcripton Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) em Thermal Cycler Veriti (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Para a reação de amplificação foram utilizados: cDNA, sondas de hidrólise (TaqMan), iniciadores e TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). A reação de amplificação ocorreu de acordo com a seguinte ciclagem: 1 ciclo a 95°C por 20 seg, 40 ciclos a 95°C por 1 seg e 60°C por 20 seg. Foi realizado o teste de eficiência para todas as sondas de hidrólise. Considerou-se

aceitável a eficiência na faixa de 90 à 110%. Para o cálculo da expressão foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Os resultados da quantificação da expressão relativa de RNAm foram obtidos por meio do equipamento ViiA 7 Real-Time PCR System (Life Technologies, Grand Island, NY; USA).

Tabela 3 – Genes alvos de ratos e camundongos investigados nos ensaios de PCR em tempo real (*Life Technologies*).

Genes	Número de catálogo Ratos	Número de Catálogo Camundongos
TRPV1	Rn00583117_m1	Mm01246302_m1
CNB-1 (CB1)	Rn00562880_m1	Mm01212171_s1
TNF-α	Rn99999017_m1	Mm00443258_m1
IL-6	Rn00580432_m1	Mm00434228_m1
IL-1β	Rn01410330_m1	Mm00446190_m1
B-actina	Rn00667869_m1	Mm00607939_s1

3.16. Análises estatísticas

Os dados coletados foram comparados entre os grupos em estudo e seus respectivos controles pelo teste *Mann–WhitneyU* para dados contínuos e teste de Fisher para dados categóricos (GraphPad 5.0 software; Prism, San Diego, CA). Valores densitométricos da sequência de RNAm mencionado e proteínas são apresentados como a razão de β-actina em PCR em tempo real e GAPDH em ensaios de western blot respectivamente. Os valores densitométricos de uma amostra controle de cada blot foi definida como 1,0 (100%) e os subsequentes valores foram expressos na relação de seus valores comparados aos controles. As relações obtidas na unidade arbitrária foram então submetidas à análise estatística com o teste *Mann-Whitney U*. Valores de $P<0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Cultura das células epiteliais da córnea e resposta a estímulos ao TRPV1 e CB1

As culturas primárias de células epiteliais da córnea de ratos demostraram confluência de 80% por volta do 7° dia e concentração de células de $8,5x10^4$/ml ± 26,17 e viabilidade de 60,18±10,23 % após a interrupção da cultura no 7º dia (Figura 5A).

A confirmação da linhagem de células epiteliais se deu pela positividade a proteína de citoesqueleto, pancitoqueratina, da presença do receptor para TRPV-1 pela positividade na reação com o anticorpo anti-VR1, da presença do receptor canabinóide pela positividade com o CB 1 e da possibilidade de normalizar os resultados com a expressão da proteína β-actina pela demonstração da linearidade da expressão dessa com a exposição de concentrações crescentes de proteína do homogeneizado de células obtidas de cultura ao anticorpo anti beta-actina (Figura 5B). Esses exames foram feitos por *Western blotting* com homogeneizados de células obtidas *de* cultura primária da córnea de ratos Wistar machos.

No 7º dia, após a confluência da cultura em cerca de 80%, após a troca do meio de cultura, o estímulo por 1 hora, com os seguintes agentes nas respectivas concentrações CAP (1µM) (agonisa de TRPV1), CPZ (1µM) (antagonista de TRPV1), Win (1µM) (agonista de CB1), Win + CAP (1µM e 1µM, respectivamente) e CAP+ CPZ (1µM e 1µM, respectivamente), observou-se queda no número de células viáveis no sobrenadante após a tripsinização dessas células. Os grupos onde as células receberam estímulo de CAP+CPZ tiveram o número de células viáveis no sobrenadante reduzido a zero, indicando toxicidade dessa combinação (Figura 5C).

A produção de TNF-α (barras brancas) e interleucina 1β (IL-1β) (barras pretas) no sobrenadante da cultura em resposta aos mesmos estímulos foi nula diante da exposição de CPZ a 1µM e máxima com a combinação de CAP + CPZ (1µM e 1µM, respectivamente) (Figura 5D). Esses niveis aumentados de TNFα cujos efeitos pro-apoptóticos já são conhecidos, podem explicar a ausência de células epiteliais de córnea viáveis no sobrenadante das culturas.

Os níveis IL-1β foram nulos nas amostras controles e tiveram maior aumento nas condições de estímulo por CPZ a 1µM e estímulo combinado de Win+CAP (1µM e 1µM, respectivamente) (Figura 5D). Esses achados indicam que a combinação de CAP+ CPZ teve a capacidade de reduzir o efeito pro-inflamatório da CPZ, mas que a os estímulos simultâneos de TRPV1 e CB1 com CAP+Win levaram a um estímulo secretor de IL-1β.

O ensaio de influxo de cálcio avaliou a entrada de Ca^{2+} nas células epiteliais de córnea de ratos em cultura após o estímulo direto de CAP 1µM para ativação de TRPV1. Observamos um aumento do influxo de Ca^{2+} mediado pela CAP nessas células (Figura 5E).

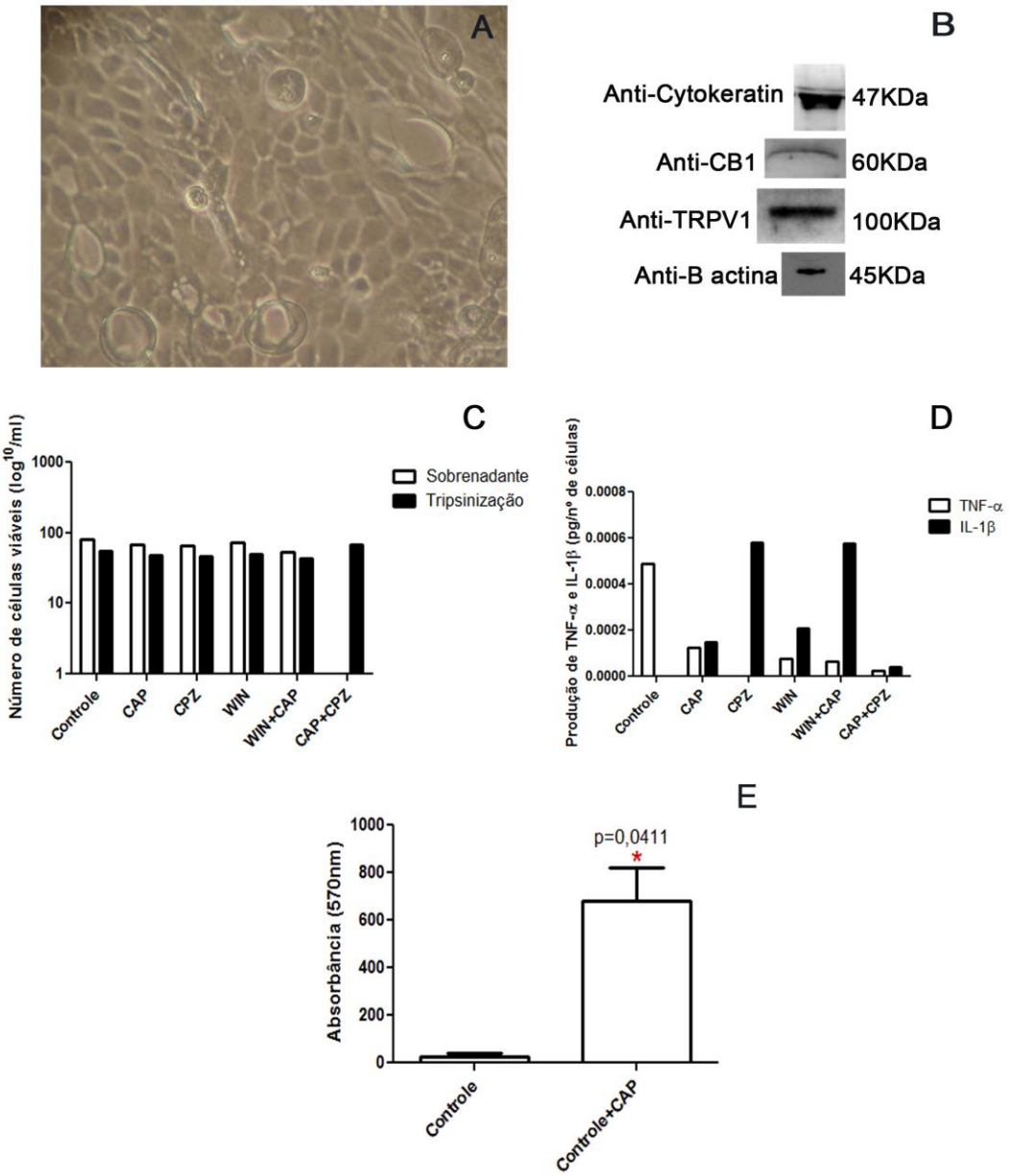

Figura 5 – Cultura das células epiteliais da córnea e resposta a estímulos ao TRPV1 e CB1. **(A)** Confluência da cultura celular primária do epitélio da córnea de ratos wistar machos após 7 dias com um número total de células de 60 e 70%. As imagens foram realizadas no microscópio invertido para cultura celular TCM400 (Labo America, Fremont, CA, USA) (magnificação de 200x). **(B)** Membrana de nitrocelulose com a marcação dos receptores Citoqueratina, Anti- CB1, β actina e Anti VR-1 como demostrado na intensidade das bandas. **(C)** Comparação entre número de células viáveis no sobrenadante (barras brancas) e aderidas à placa após 1 hora com estimulação de poços controle e estimulados com CAP, CPZ, Win, Win+CAP, CAP+CPZ cada um na concentração de 1µM, e número de células viáveis que estavam aderidas no fundo da placa de cultura após o estímulo (barras pretas) (n= 3poços). **(D)** Produção de TNFα (barras brancas) e IL1-β (barras pretas) no sobrenadante das células estimuladas após 1 hora com agonistas e antagonistas dos receptores de CB1 e TRPV1. A dosagem foi realizada através do método de ELISA com os kits TNFα e IL1-β (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA). A leitura foi feita no espectrofotômetro SpectraMax (M3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). **(E)** Influxo de cálcio, marcado com fluorescência em células do epitélio de córnea, poços estimulados ou não com CAP a 1µM.

4.2. Papel do TRPV1 em córnea e GL de ratos com DM

O ensaio de PCR em tempo real para RNAm de TRPV1, IL-6, IL-1β e TNFα, mostraram expressão relativa similar de TRPV1 em DM e controle, tanto na córnea como na GL, menor expressão de IL-6 nos dois tecidos do grupo DM, de IL-1β apenas na córnea e de TNFα apenas na GL (Figura 6A).

A análise comparativa da expressão da proteína do receptor TRPV1 em homogeneizados de córnea de ratos Wistar controle, comparados com diabéticos por estreptozotocina (DM), após 8 semanas de doença normalizado pelo GAPDH, no grupo de DM resultou em grande variabildiade na expressão relativa desse receptor e ausência de diferença signifcativa comparada a córneas de ratos controles saudáveis (p=0,8857), confirmando os achados observados no qRT-PCR e WB (Figura 6 A-C).

A expressão de TRPV1 em córnea e GL de ratos com DM induzido por injeção única de estreptozotocina, confirmou a presença desse receptor nas camada apical do epitélio e nas estruturas acinares da GL. As imagens sugerem que os animais com DM, apresentam maior expressão desse receptor (Figura 6 F e I).

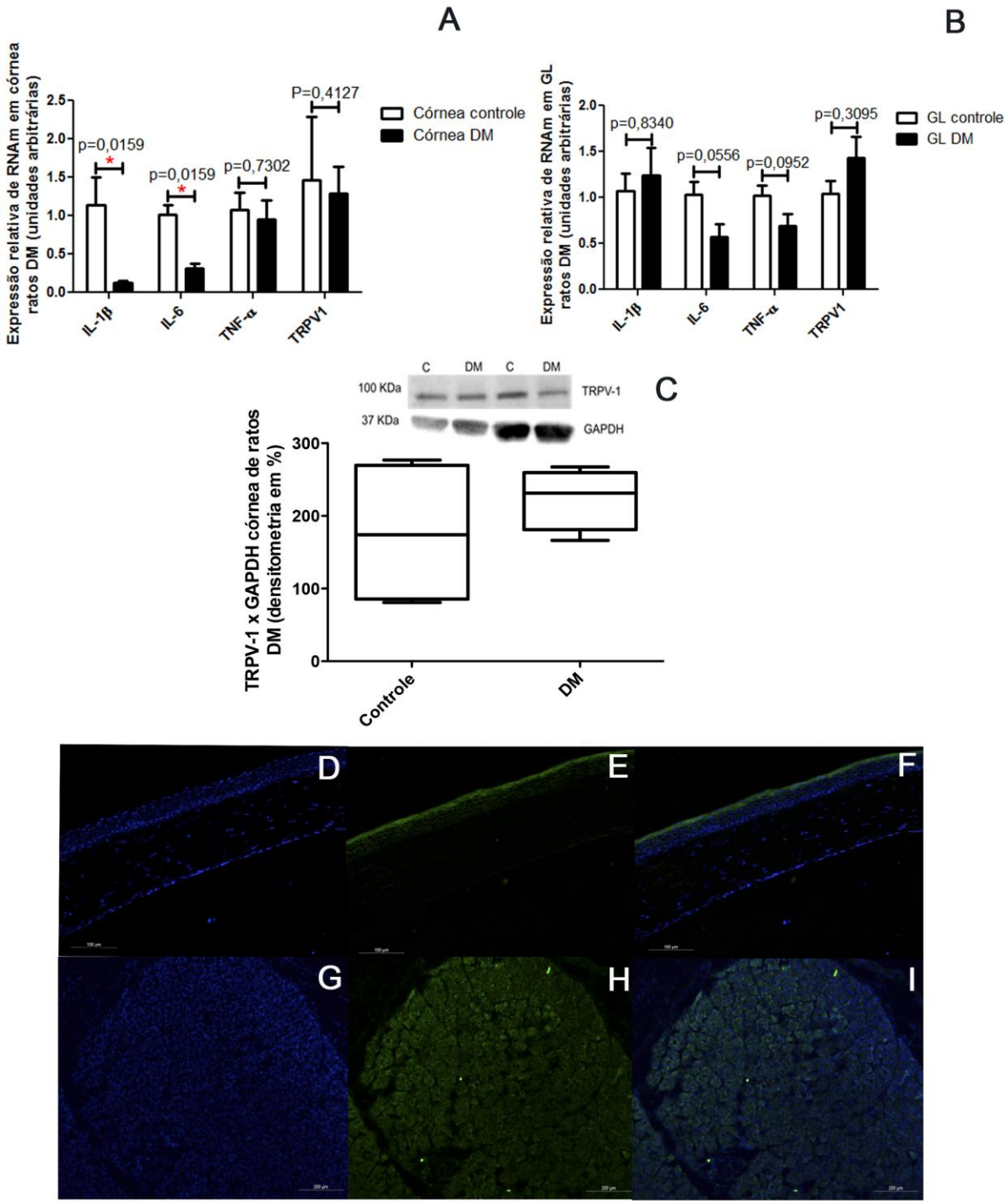

Figura 6 **–** Papel do TRPV1 em córnea e GL de ratos com DM **(A e B)** Expressão de RNAm por PCR em tempo real em córnea e GL de ratos controles e DM. A comparação foi feita na expressão de IL-1β, IL-6, TNFα e TRPV1 entre controles (barras brancas) e DM (barras pretas), em homogenados de córnea **(A)** e GL **(B)**. **(C)** Quantificação de TRPV1 na córnea dos ratos diabéticos pela técnica de *western blotting*. Os valores foram determinados pela relação na densidade relativa de TRPV1/GAPDH (controle endógeno), indicando um dos controles como 100% e fazendo o cálculo relativo dos outros (n=8/grupo). **(D – G)** Expressão de TRPV1 por imunofluorescência de córnea e GL. **(D)**, **(E)** e **(F)** grupo DM em córnea e**(G)**, **(H)** e **(I)** grupo DM na GL. (Magnificação 200x, marcação nuclear com DAPI).

4.3. Papel do TRPV1 em córnea e GL de ratos tratados com colírio BAC 0,2%

A expressão do RNAm do TRPV1 ficou diminuída nas córneas que receberam BAC 0,2% e da mesma forma, as citocinas pró-inflamatorias IL-1β e TNFα tiveram sua expressão diminuída, nessas córneas (Figura 7A). A expressão do RNAm de IL-1β, IL-6 e TNFα não se alteraram na GL, porém o receptor TRPV1 teve uma diferença significativa, comparando tratados com BAC 0,2% e controles (Figura 7B).

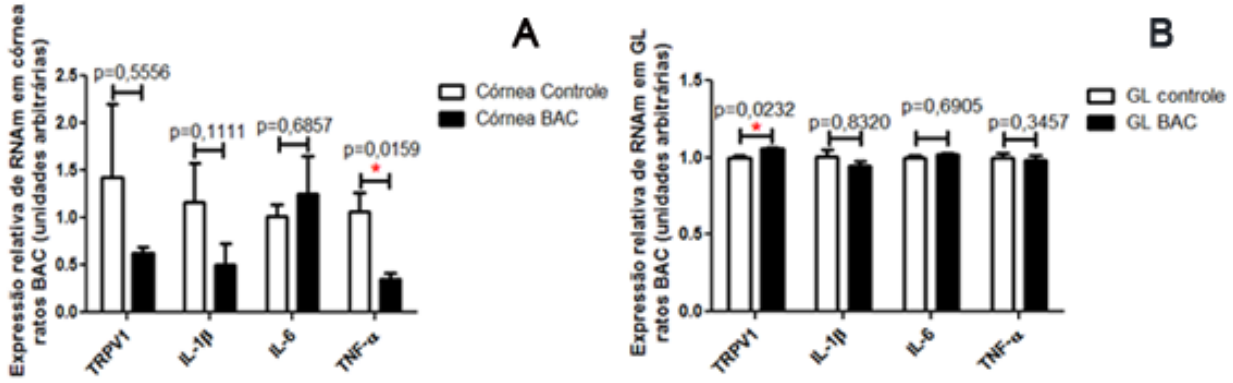

Figura 7 – Papel do TRPV1 em córnea e GL de ratos tratados com colírio BAC 0,2%. Expressão relativa do RNAm de TRPV1, IL-1β, IL-6, e TNFα em córnea **(A)** e GL **(B)** de ratos controle (barras brancas) e tratados com BAC 0,2% (barras pretas).

4.4. A superfície ocular e resposta à agressão à córnea nos Camundongos TRPV1-/-

Os camundongos TRPV1-/- tem fenótipo físico e ocular similar aos seus congêneres selvagens (C57) (Figura 8 A-D). A medida da secreção lacrimal pelo teste do fenol vermelho foi similar entre machos e fêmeas do grupo TRPV1-/- e similar a secreção das fêmeas C57, porém inferior à secreção dos machos C57 (n=5/grupo, p=0,0410) (Figura 8 E). A estrutura histológica da córnea e da GL também foi similar entre os TRPV1-/- e os controles e entre machos e fêmeas do grupo TRPV1-/- (Figura 8 F, G, I e J). A espessura da córnea foi maior no grupo TRPV1-/- comparado com o grupo C57 (Figura H).

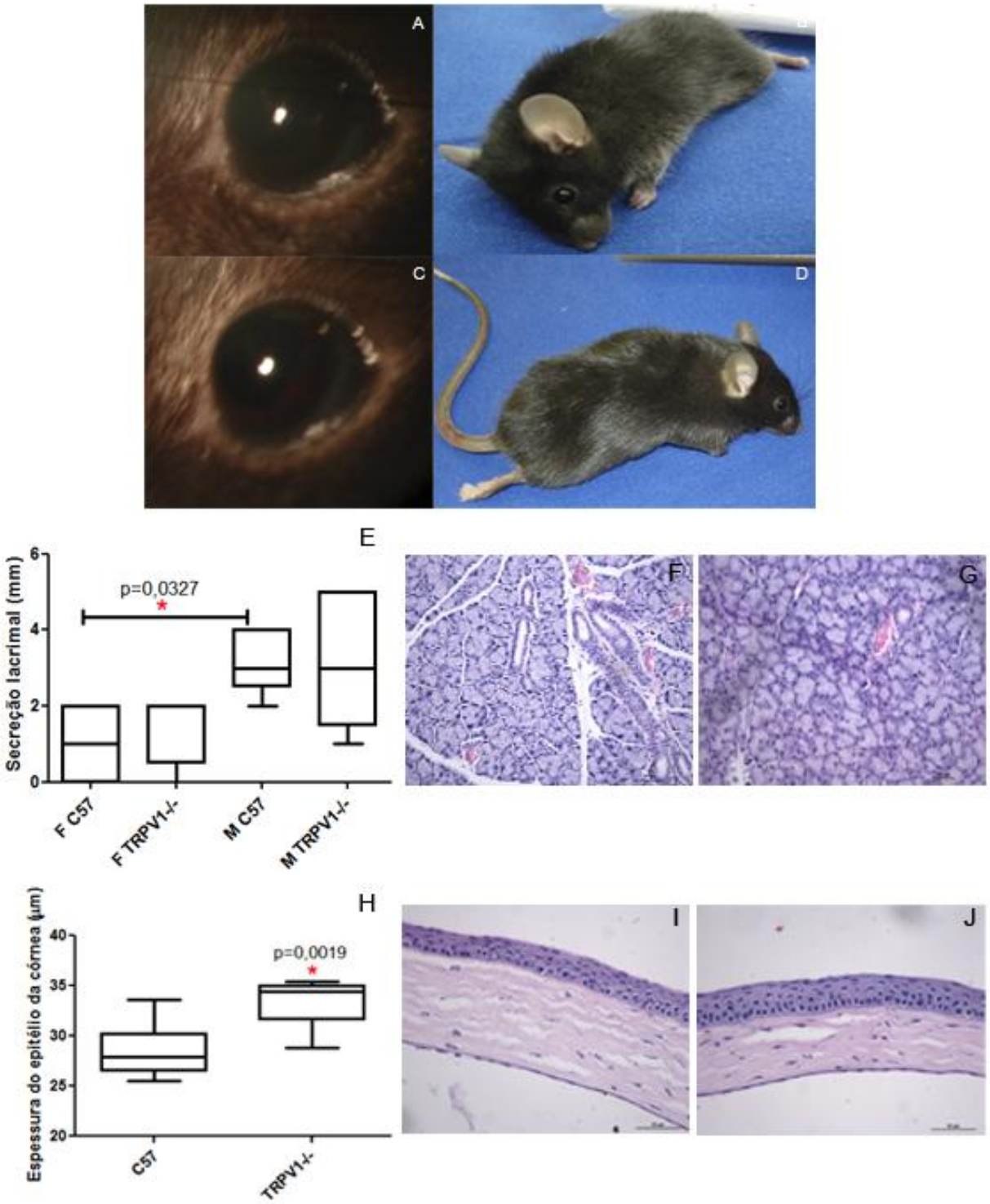

Figura 8 – A superfície ocular e resposta à agressão à córneanos camundongos TRPV1-/-. **(A** e **B)** camundongos C57 e **(C** e **D)** camundongos TRPV1-/-. **(E)** A medida da secreção lacrimal pelo teste do fenol vermelho foi similar entre machos e fêmeas do grupo TRPV1-/- (3,20±0,80 e 1,50±0,50p=0,2008) e similar a secreção das fêmeas C57 (1,00±0,57), porém inferior a secreção dos machos C57 (3,20±0,37) (n=5/grupo, p=0,0410 **(F** e **I)** H&E de GL e córnea de camundongos C57 e **(G** e **J)** H&E de GL e córnea de camundongos TRPV1-/-.). **(H)** A espessura da córnea foi maior no grupo TRPV1-/- comparado com o grupo C57 (33,30±0,73 e 28,54±0,79 , p=0,0019).

Três formas de diferentes intensidades de agressão à superfície ocular foram induzidas nos camundongos TRPV1-/- para comparar as respostas comportamentais, clínicas, morfológicas e moleculares com os seus controles camundongos C57. São elas:

a) a provocação com gota única de colírio de Capsaicina a 1μM (CAP 1μM);

b) o tratamento com colírio de cloreto de benzalcônio a 0,2% duas vezes por dia, por 7 dias,

c) queimadura alcalina da córnea com NaOH a 1M por 30 segundos.

Todas essas intervenções foram feitas nos olhos direitos de TRPV1-/- e controles e avaliados nos períodos indicados abaixo pós-agressão.

a) Provocação com colírio de CAP a 1μM

A provocação da superfície ocular com o colírio de CAP a 1μM induziu incômodo ocular no OD (olho direito) dos camundongos, que foi significativamente menor, medido pelo movimento de pata ao olho, nos animais TRPV1-/- do que nos controles C57 (Figura 9A).

Não houve diferença na secreção lacrimal, entre os OD dos camundongos dos 2 grupos, medida 30 minutos depois do uso de CAP a 1μM (Figura 9B). Também não houve alteração histológica da GL ou da córnea, avaliadas imediatamente após o uso do colírio de CAP a 1μM (Figura 9 C, D, F e G).

A espessura da córnea, medida e cortes sagitais da córnea (2 horas) após a aplicação do colírio de CAP a 1μM foi semelhante entre os OD de TRPV1-/- e controles C57 (Figura 9E). Esses dados sugerem que o colírio de CAP a 1μM ou o movimento repetido da pata no olho pode ter induzido edema epitelial nos que receberam o colírio.

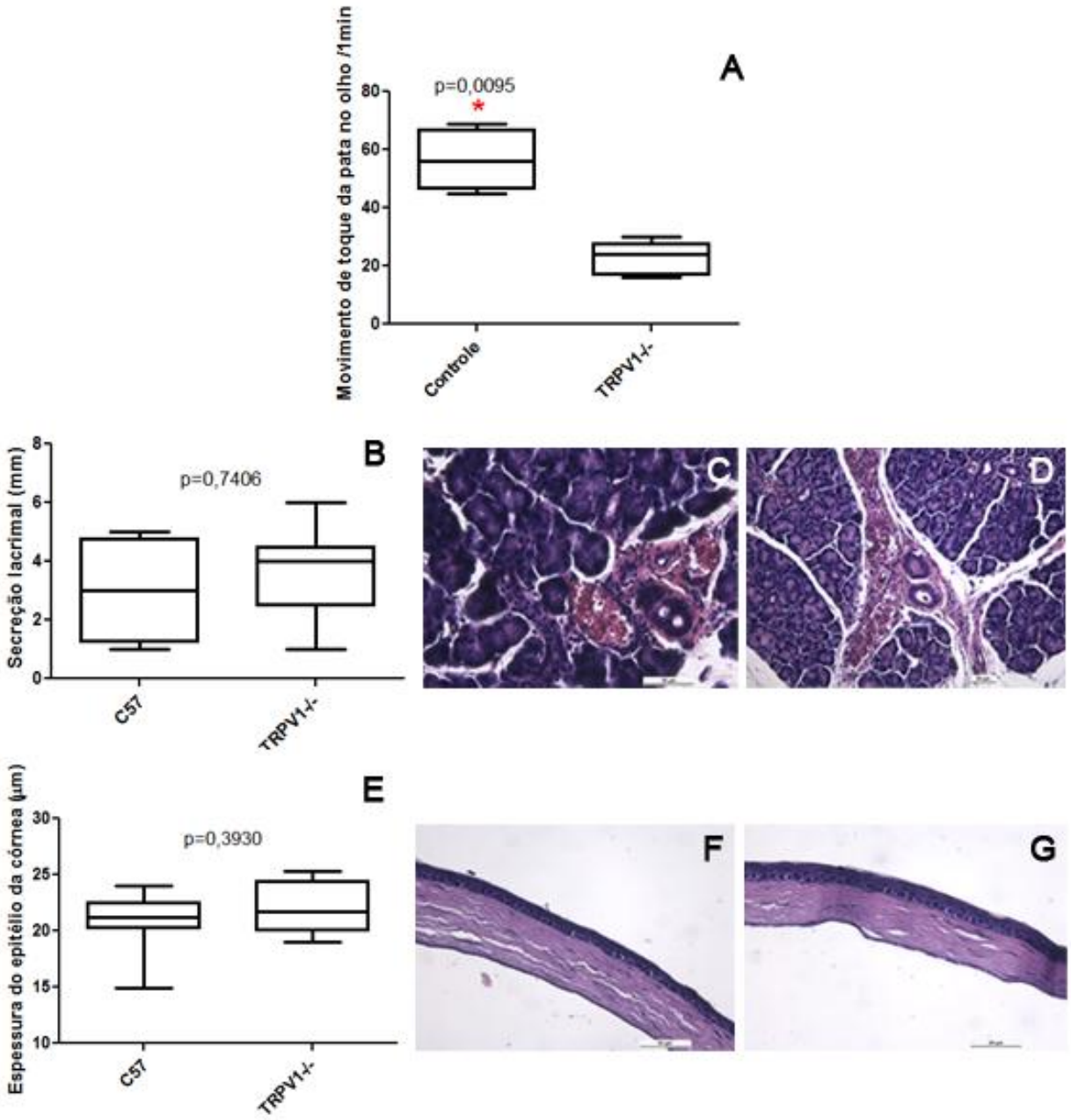

Figura 9 **– Provocação com colírio CAP a 1µM. (A)** .Contagem do movimento de toque de pata no olho dos camundongos C57 e TRPV1-/- após a aplicação de 50µl de colírio de CAP1µM durante 1 min foi maior no grupo C57 (controle); (p=0,0095). **(B)** Teste fenol vermelho na medida da secreção lacrimal dos OD de camundongos TRPV1-/- e controles C57 1 hora após aplicação do colírio de CAP1µM não apresentou diferença significativa entre os grupos (p=0,7406). **(C** e **F)** GL e córnea do grupo controle C57 e **(D** e **G)** GL e córnea do grupo TRPV1-/-. **(E)** Espessura da córnea também não teve diferença significativa entre os grupos; (p=0,3930).

b) Modelo de lesão corneana por colírio BAC a 0,2%

A medida da secreção lacrimal após o tratamento com BAC 0,2% pelo teste do fenol vermelho foi similar entre machos e fêmeas do grupo TRPV1-/- (1,40±0,37 e 1,12±0,35) e similar a secreção das fêmeas C57 (1,25±0,36), porém inferior a secreção dos machos C57 (3,20±0,42) (n= 5/grupo; p=0,0011,) (Figura 10 A).

A espessura do epitélio da córnea foi igualmente menor nos olhos tratados com BAC a 0,2 % dos dois grupos (TRPV1-/- e C57) e menor do que nos olhos dos controles C57 que não receberam colírio (Figura 10 D)

A histologia usando corante H&E da córnea, gânglio trigêmeo (GT) e glândula lacrimal (GL) de camundongos TRPV1-/- e seus controles C57 tratados com BAC 0,2% 2 vezes ao dia durante 7 dias no olho direito (OD) revelou similaridade nas estruturas teciduais entre os 2 grupos e comparadas aos lados opostos não expostos ao colírio de BAC a 0,2 % (Figura 10B, C, E- J).

Não houve diferença significativa na expressão de IL-1β, IL-6 ou TNFα entre as GL tratadas ou não tratadas com BAC a 0,2 % de TRPV1-/- e C57.

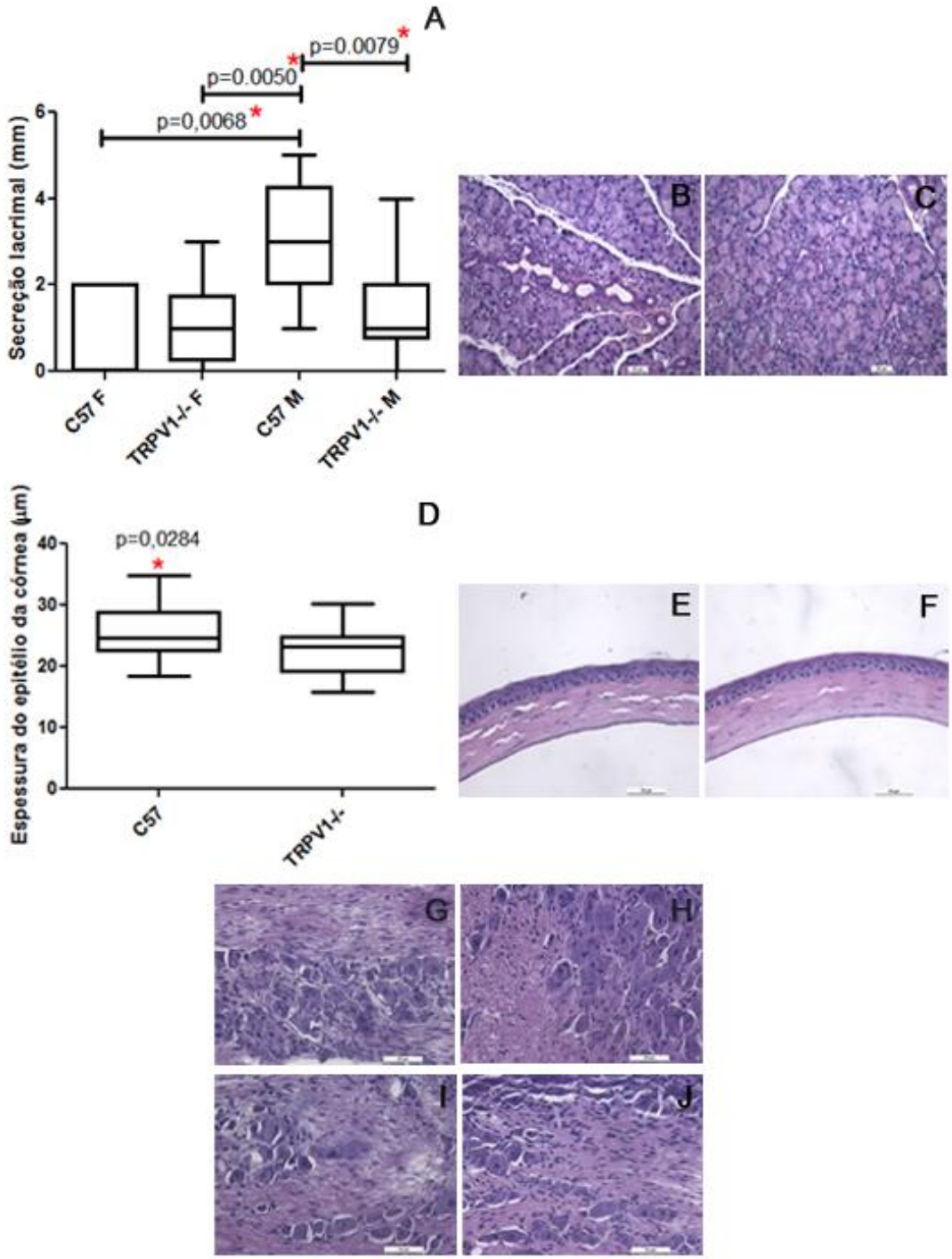

Figura 10 – Modelo de lesão corneana por colírio BAC 0,2%. **(A)** Teste fenol vermelho medindo a quantidade de secreção lacrimal (mm) entre camundongos C57 e TRPV1-/- machos e fêmeas, após 7 dias de uso tópico de BAC a 0,2% (n=5/grupo e p=0,0011).**(D)** Espessura do epitélio da córnea, os tecidos foram colhidos no 7º dia (n=5/grupo, p=0,0284). **(B e E)** H&E de GL e córnea de camundongos C57.**(C e F)** H&E de GL e córnea de camundongos TRPV1-/-. Aspecto histológico do tecido GT **(G)** GT esquerdo C57, **(H)** GT direito C57, **(I)** GT esquerdo TRPV1-/- e **(J)** GT direito TRPV1-/-. Os lados expostos ao tratamento não diferem dos controles contralaterais.

Tabela 4 – Expressão relativa de RNAm de IL-1β, IL-6, TNFα e TRPV1 na GL de camundongos machos e fêmeas tratados com colírio BAC 0,2%, por PCR em tempo real (n= 5/grupo).

	♂	♀
IL-1β	p= 0,1620	p= 0,9876
IL-6	p= 0,2041	p= 0,4081
TNFα	p= 0,0541	p= 0,4088
TRPV1	p= 0,3773	p= 0,1145

c) Queimadura de córnea com NaOH 1M

A queimadura da córnea central com NaOH a 1 M, por 30 segundos, em camundongos C57 e TRPV1-/- foi avaliada 7 dias depois. Os olhos que tiveram as córneas queimadas tiveram secreção lacrimal média similar a de olhos de animais não queimados (2,10±0,60 e 3,20±0,37) de camundongos machos (Figura 12 A).

A histologia corada com H&E da córnea de camundongos com queimadura de NaOH a 1M no olho direito dos grupos TRPV1-/- e C57 (controle). As córneas queimadas não tiveram aumento da espessura, porém, tiveram irregularidade estromal e epitelial, infiltrado leucocitário e desorganização da câmara anterior. A estrutura morfológica do gânglio trigêmeo e da GL exorbital não se alterou na histologia comparada aos controles (Figura 12 B, C, E - J).

A medida da espessura da córnea após a queimadura com NaOH 1M por 30 segundos, avaliada após os 7 dias de queimadura não apresentou diferença significativa entre os olhos queimados do grupo de camundongos TRPV1-/- e C57 (p=0,1202) (Figura 12 D).

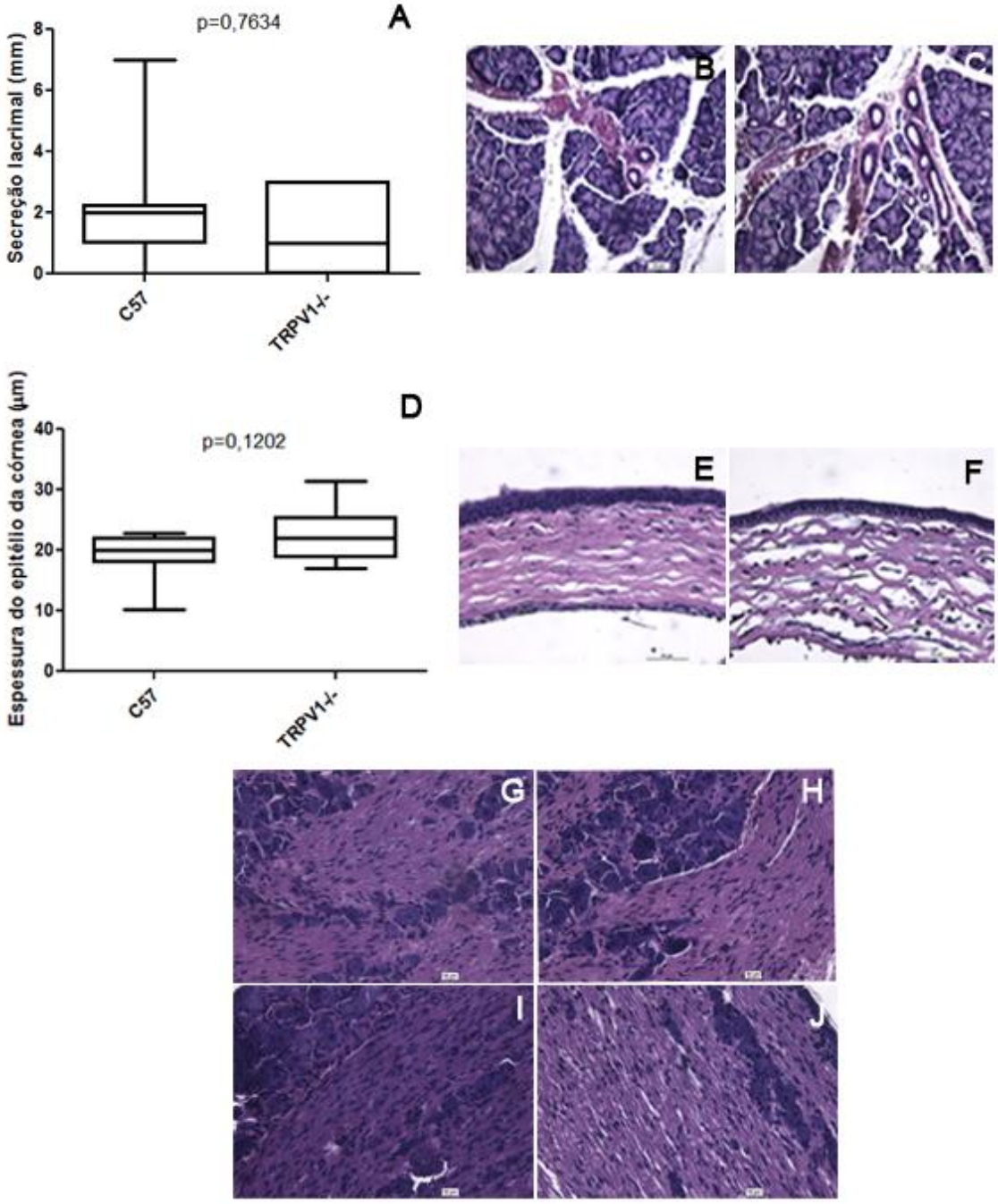

Figura 12 **–** Queimadura da córnea de camundongos com NaOH 1M. **(A)**. Secreção lacrimal realizada através do teste fenol vermelho nos OD dos animais dos grupos TRPV1-/- e C57, submetidos a queimadura alcalina com NaOH a 1M, por 30 segundos e examinados 7 dias depois (n= 5/grupo, p=0,7634). (**B, C, E – J)** Aspecto histológico da córnea, GL e GT de camundongos TRPV1-/- e C57. **(B e E)** H&E de GL e córnea de camundongo C57, **(C e F)** GL e córnea do camundongo TRPV1-/-. (Magnificação de 200x (GL) e 400x córnea) e **(G)** GT esquerdo camundongo C57, **(I)** GT direito camundongo C57. (Magnificação de 400 x).**(D)** Espessura da córnea (µm) após queimadura com NaOH 1M comparando entre as córneas do OD (queimadas) dos camundongos C57 e TRPV1-/-. (n= 5/grupo, p=0,1202).

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a presença do receptor TRPV1 em epitélio de córnea, revelou também a sua funcionalidade ao demonstrar o influxo de cálcio e o aumento de citocinas pró-inflamatórias diante do estímulo com seu agonista, a Capsaicina.

Ainda que os receptores vanilóides de potencial transitório sejam estudados na córnea, e sua expressão seja conhecida em outros tecidos epiteliais, essas observações em epitélio em cultura primária esclarece as divergências sobre resultados envolvendo o papel de terminações nervosas e células de linhagem geneticamente modificadas, e confirma achados em culturas primárias de epitélio e na camada basal do epitelio de outras espécies (Sidhaye, Guler et al. 2006, Zhang, Yang et al. 2007, Pan, Wang et al. 2011).

Esperava-se que a a combinação de CAP e CPZ tivesse um efeito nulo ou próximo ao controle em cultura celular. Curiosamente, tal associação resultou no maior aumento do TNFα nas amostras de cultura, além de elevação de IL-1β superior ao CAP isoladamente, e a maior redução das células viáveis na cultura celular (Figura 5).

A explicação para tais eventos pode estar relacionada com a dose das substâncias e bloqueio de mecanismo fisiológico de manutenção das atividades celulares, seguida de morte celular mediada por esses fatores.

O DM, que produz reconhecidas e profundas alterações na córnea e GL levando a olho seco e problemas de epitelização e cicatrização atribuidos a cornea neuropática, não levou a alteração na expressão do TRPV1 nesses tecidos, dentro do período estudado. Por outro lado, o RNAm das citocinas IL-β e IL-6 tiveram a expressão diminuída na córnea dos ratos com DM e uma tendência de diminuição do IL-6 também na GL desses. Em um estudo prévio, se observou aumento de IL-1β e TNFα na lágrima de ratos com DM, após 10 semanas de doença. Esses achados podem representar momentos distintos da doença (Boel, Selmer et al. 1995, Alves, Calegari et al. 2005, Cousen, Cackett et al. 2007, Ziegler, Papanas et al. 2014). Em fases mais tardias, a instalação da córnea neuropática, pode configurar um quadro mais completo de alterações da relação neuroimune relacionados à progressão dessa doença e o seu

entendimento pode abrir caminhos para alternativas terapêuticas para a ceratite neurotrófica do DM, incluindo bloqueadores dessas citocinas.

Por outro lado, a ação reconhecidamente neurotóxica do BAC, na forma de colírio, principlamente no tratamentodo glaucoma, leva a ceratite, denervação, redução da secreção lacrimal e outras complicações (Baffa Ldo, Ricardo et al. 2008, Marques, Alves et al. 2015). Nesse modelo de córnea neuropática, o TRPV1 parece ter papel relevante e precoce (já com 7 dias), desde que usado em concentração 10 vezes superior a presente nos colírios. O nosso estudo revelou a redução do RNAm do TRPV1 na GL e uma tendência bem nìtida da redução desse na córnea, além de redução TNFα e tendência à redução de IL-1β e, sugerindo que a redução desses mediadores inflamatórios acompanhe a redução do TRPV1 e portanto poderia ser em parte mediada por esse receptor, que detectas as alterações no ambiente

Os camundongos TRPV1-/- propiciaram uma série de observações comparativas com os modelos animais que normalmente possuem esse receptor. Estudos anteriores revelam que a cicatrização da queimadura alcalina da córnea é atenuada e permite melhor recuperação da transparência nos animais TRPV1-/- (Okada, Reinach et al. 2011). No presente estudo os animais tiveram fenótipo geral e ocular, histologia e secreção lacrimal similar aos camundongos-controles. Eles também não tiveram diferença entre os sexos feminino e masculino. O único aspecto fenotípico que mais chamou a atenção foi a espessura do epitélio da córnea maior que nos animais C57.

Em resposta a três níveis de intensidade de agressão à córnea, os camundongos demonstraram respostas distintas dos controles.

Diversos aspectos comportamentais e reações a estímulos foram avaliados em camundongos TRPV1-/- com diferentes respostas dependendo da natureza do estímulo e fase da vida (Caterina, Leffler et al. 2000, Toth, Szoke et al. 2011, Wanner, Garami et al. 2011). Pela primeira vez a provocação com gota única, tópica ocular de CAP foi avaliada. Esse experimento revelou menor sensibilidade corneana nos camundongos TRPV1-/-, medida pelo movimento de coçar o olho, do que nos controles.

Nos camundongos submetidos a 7 dias de aplicação tópica de BAC, os machos TRPV -/- tiveram maior redução na secreção lacrimal e maior redução na espessura do epitélio da córnea, comparados aos C57 submetidos ao mesmo tratamento, sugerindo uma sucetibilidade ainda maior a esse agente neurotóxico do que as linhagens que expressam normalmente o TRPV1 (Marques et al. 2015).

A queimadura da córnea com NaOH é um problema ocular grave, e como mencionado acima, já foi demonstrado que a ausência do TRPV1 reduz o dano tecidual, provavelmente por atenuar a resposta inflamatória (Okada, Reinach et al. 2011). Os nossos experimentos confirmam essa melhor restauração tecidual e indicaram que a espessura do epitélio foi maior após 07 dias de queimadura do que nos controles. Além disso, a estrutura da GL não foi alterada. O GT do lado queimado também não foi alterado, como ocorreu em camundongos normais em um estudo recente (Ferrari, Bignami et al. 2014). Isso sugere que a falta do receptor TRPV1 pode estar comprometendo a transmissão axonal e repercussões inflamatórias nos tecidos anexos.

Em resumo, o presente estudo revela as interações do receptor de canal iônico TRPV1, presente no epitélio da córnea, com as respostas celulares, teciduais e comportamentais a diferentes estímulos nocioceptivos agudos e condições neuropáticas como o DM e colírio de BAC.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

O estudo concluiu que TRPV1 e CB1 estão expressos nas células epiteliais de córnea de ratos e o RNAm de TRPV1 também na de camundongos e ratos e na GL de ratos. Os estímulos externos induzem efeitos intra-celulares, parácrinos, comportamentais e histológicos mediados pelo TRPV 1.

6.1.Conclusões Específicas

1. Os receptores CB1, TRPV1 estão presentes em epitélio de córnea em cultura primária e a induzem a resposta inflamatória pelos seus agonistas.
2. A doença da córnea induzida por BAC a 0,2% alterou a expressão do RNAm do TRPV1na GL e da citocina TNF-α em córnea de ratos. O DM por 5 semanas diminuiu a expressão de citocinas IL-6 e IL-1β na córnea, sem alterar a expressão de TRPV1.
3. A superfície ocular de camundongos TRPV1-/- bem como os aspectos físicos e histológicos oculares são normais, comparados aos controles C57. Estímulos nocioceptivos revelaram diminuição da sensibilidade, modulação de citocinas no caso do estímulo com BAC e na espessura epiteliais tanto no BAC como na queimadura com NaOH.

7. Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, C. A., R. A. Malik, E. R. van Ross, J. Kulkarni and A. J. Boulton (2011). "Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the U.K." Diabetes Care **34**(10): 2220-2224.

Acs, G., M. Palkovits and P. M. Blumberg (1994). "[3H]resiniferatoxin binding by the human vanilloid (capsaicin) receptor." Brain Res Mol Brain Res **23**(3): 185-190.

Alves, M., V. C. Calegari, D. A. Cunha, M. J. Saad, L. A. Velloso and E. M. Rocha (2005). "Increased expression of advanced glycation end-products and their receptor, and activation of nuclear factor kappa-B in lacrimal glands of diabetic rats." Diabetologia **48**(12): 2675-2681.

American Diabetes, A. (2015). "(2) Classification and diagnosis of diabetes." Diabetes Care **38 Suppl**: S8-S16.

Baffa Ldo, P., J. R. Ricardo, A. C. Dias, C. M. Modulo, A. M. Braz, J. S. Paula, L. Rodrigues Mde and E. M. Rocha (2008). "Tear film and ocular surface alterations in chronic users of antiglaucoma medications." Arq Bras Oftalmol **71**(1): 18-21.

Bartho, L., C. Stein and A. Herz (1990). "Involvement of capsaicin-sensitive neurones in hyperalgesia and enhanced opioid antinociception in inflammation." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **342**(6): 666-670.

Baudouin, C. (1996). "Side effects of antiglaucomatous drugs on the ocular surface." Curr Opin Ophthalmol **7**(2): 80-86.

Baumann, T. K., D. A. Simone, C. N. Shain and R. H. LaMotte (1991). "Neurogenic hyperalgesia: the search for the primary cutaneous afferent fibers that contribute to capsaicin-induced pain and hyperalgesia." J Neurophysiol **66**(1): 212-227.

Baynes, J. W. (1991). "Role of oxidative stress in development of complications in diabetes." Diabetes **40**(4): 405-412.

Bernstein, J. E., R. M. Swift, K. Soltani and A. L. Lorincz (1981). "Inhibition of axon reflex vasodilatation by topically applied capsaicin." J Invest Dermatol **76**(5): 394-395.

Boel, E., J. Selmer, H. J. Flodgaard and T. Jensen (1995). "Diabetic late complications: will aldose reductase inhibitors or inhibitors of advanced glycosylation endproduct formation hold promise?" J Diabetes Complications **9**(2): 104-129.

Bouaboula, M., C. Poinot-Chazel, B. Bourrie, X. Canat, B. Calandra, M. Rinaldi-Carmona, G. Le Fur and P. Casellas (1995). "Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1." Biochem J **312 (Pt 2)**: 637-641.

Brodovsky, S. C., C. A. McCarty, G. Snibson, M. Loughnan, L. Sullivan, M. Daniell and H. R. Taylor (2000). "Management of alkali burns : an 11-year retrospective review." Ophthalmology **107**(10): 1829-1835.

Bromberg, B. B. and M. H. Welch (1985). "Lacrimal protein secretion: comparison of young and old rats." Exp Eye Res **40**(2): 313-320.

Brownlee, M. (2001). "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." Nature **414**(6865): 813-820.

Brownlee, M., A. Cerami and H. Vlassara (1988). "Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications." N Engl J Med **318**(20): 1315-1321.

Caterina, M. J., A. Leffler, A. B. Malmberg, W. J. Martin, J. Trafton, K. R. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A. I. Basbaum and D. Julius (2000). "Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor." Science **288**(5464): 306-313.

Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine and D. Julius (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." Nature **389**(6653): 816-824.

Chad, D., C. Rasool, W. G. Bradley, P. Good and S. Reichlin (1983). "Unmyelinated axon subpopulations in the rat peripheral nervous system." Neurology **33**(7): 848-852.

Chung, J. M., K. H. Lee, Y. Hori and W. D. Willis (1985). "Effects of capsaicin applied to a peripheral nerve on the responses of primate spinothalamic tract cells." Brain Res **329**(1-2): 27-38.

Clapham, D. E., D. Julius, C. Montell and G. Schultz (2005). "International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels." Pharmacol Rev **57**(4): 427-450.

Compton, D. R., L. H. Gold, S. J. Ward, R. L. Balster and B. R. Martin (1992). "Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta 9-tetrahydrocannabinol." J Pharmacol Exp Ther **263**(3): 1118-1126.

Cousen, P., P. Cackett, H. Bennett, K. Swa and B. Dhillon (2007). "Tear production and corneal sensitivity in diabetes." J Diabetes Complications **21**(6): 371-373.

Curfs, J. H., J. F. Meis and J. A. Hoogkamp-Korstanje (1997). "A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers." Clin Microbiol Rev **10**(4): 742-780.

Debbasch, C., F. Brignole, P. J. Pisella, J. M. Warnet, P. Rat and C. Baudouin (2001). "Quaternary ammoniums and other preservatives' contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(3): 642-652.

Di Marzo, V. and L. De Petrocellis (2010). "Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: A further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs." Curr Med Chem **17**(14): 1430-1449.

Dray, A. (1992). "Neuropharmacological mechanisms of capsaicin and related substances." Biochem Pharmacol **44**(4): 611-615.

Erdelyi, L., G. Such and G. Jancso (1987). "Intracellular and voltage clamp studies of capsaicin induced effects on a sensory neuron model." Acta Physiol Hung **69**(3-4): 481-492.

Faria e Souza, S. J., A. C. O. Romano, E. Espana, S. H. Yoo, S. C. Tseng and J. A. P. Gomes (2006). Anatomia Funcional da Superfície Ocular. Superfície Ocular. J. A. P. Gomes and M. R. Alves. Rio de Janeiro, Cultura Médica**:** 3-13.

Felder, C. C., K. E. Joyce, E. M. Briley, J. Mansouri, K. Mackie, O. Blond, Y. Lai, A. L. Ma and R. L. Mitchell (1995). "Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors." Mol Pharmacol **48**(3): 443-450.

Fernandes, A. P., A. E. Pace, M. L. Zanetti, M. C. Foss and E. A. Donadi (2005). "[Immunogenetic factors associated with type 1 diabetes mellitus]." Rev Lat Am Enfermagem **13**(5): 743-749.

Ferrari, G., F. Bignami, C. Giacomini, E. Capitolo, G. Comi, L. Chaabane and P. Rama (2014). "Ocular surface injury induces inflammation in the brain: in vivo and ex vivo evidence of a corneal-trigeminal axis." Invest Ophthalmol Vis Sci **55**(10): 6289-6300.

Ferraro, L., M. C. Tomasini, G. L. Gessa, B. W. Bebe, S. Tanganelli and T. Antonelli (2001). "The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 regulates glutamate transmission in rat cerebral cortex: an in vivo and in vitro study." Cereb Cortex **11**(8): 728-733.

Gebhard, F., H. Pfetsch, G. Steinbach, W. Strecker, L. Kinzl and U. B. Bruckner (2000). "Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans?" Arch Surg **135**(3): 291-295.

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

Gordon, A. C., A. L. Lagan, E. Aganna, L. Cheung, C. J. Peters, M. F. McDermott, J. L. Millo, K. I. Welsh, P. Holloway, G. A. Hitman, R. D. Piper, C. S. Garrard and C. J. Hinds (2004). "TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study." Genes Immun **5**(8): 631-640.

Green, B. G. (1989). "Capsaicin sensitization and desensitization on the tongue produced by brief exposures to a low concentration." Neurosci Lett **107**(1-3): 173-178.

Hayes, A. G., A. B. Hawcock and R. G. Hill (1984). "The depolarising action of capsaicin on rat isolated sciatic nerve." Life Sci **35**(15): 1561-1568.

Herzberg, U., E. Eliav, G. J. Bennett and I. J. Kopin (1997). "The analgesic effects of R(+)-WIN 55,212-2 mesylate, a high affinity cannabinoid agonist, in a rat model of neuropathic pain." Neurosci Lett **221**(2-3): 157-160.

Hiura, A. and Y. Sakamoto (1987). "Quantitative estimation of the effects of capsaicin on the mouse primary sensory neurons." Neurosci Lett **76**(1): 101-106.

Holman, N., R. J. Young and W. J. Jeffcoate (2012). "Variation in the recorded incidence of amputation of the lower limb in England." Diabetologia **55**(7): 1919-1925.

Holzer, P. (1991). "Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons." Pharmacol Rev **43**(2): 143-201.

Ishizaki, M., G. Zhu, T. Haseba, S. S. Shafer and W. W. Kao (1993). "Expression of collagen I, smooth muscle alpha-actin, and vimentin during the healing of alkali-burned and lacerated corneas." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**(12): 3320-3328.

Jeske, N. A., A. M. Patwardhan, N. Gamper, T. J. Price, A. N. Akopian and K. M. Hargreaves (2006). "Cannabinoid WIN 55,212-2 regulates TRPV1 phosphorylation in sensory neurons." J Biol Chem **281**(43): 32879-32890.

Kahook, M. Y. and R. Noecker (2008). "Quantitative analysis of conjunctival goblet cells after chronic application of topical drops." Adv Ther **25**(8): 743-751.

Kinoshita, S., W. Adachi, C. Sotozono, K. Nishida, N. Yokoi, A. J. Quantock and K. Okubo (2001). "Characteristics of the human ocular surface epithelium." Prog Retin Eye Res **20**(5): 639-673.

Labbe, A., O. Terry, E. Brasnu, C. Van Went and C. Baudouin (2012). "Tear film osmolarity in patients treated for glaucoma or ocular hypertension." Cornea **31**(9): 994-999.

LaVail, J. H., W. E. Johnson and L. C. Spencer (1993). "Immunohistochemical identification of trigeminal ganglion neurons that innervate the mouse cornea: relevance to intercellular spread of herpes simplex virus." J Comp Neurol **327**(1): 133-140.

Leung, E. W., F. A. Medeiros and R. N. Weinreb (2008). "Prevalence of ocular surface disease in glaucoma patients." J Glaucoma **17**(5): 350-355.

Lin, E., S. E. Calvano and S. F. Lowry (2000). "Inflammatory cytokines and cell response in surgery." Surgery **127**(2): 117-126.

Lutty, G. A. (2013). "Effects of diabetes on the eye." Invest Ophthalmol Vis Sci **54**(14): ORSF81-87.

Marfurt, C. F., R. E. Kingsley and S. E. Echtenkamp (1989). "Sensory and sympathetic innervation of the mammalian cornea. A retrograde tracing study." Invest Ophthalmol Vis Sci **30**(3): 461-472.

Marques, D. L., M. Alves, C. M. Modulo, L. E. C. M. Silva, P. Reinach and E. M. Rocha (2015). "Lacrimal Osmolarity and ocular surface in experimental model of dry eye caused by toxicity." Rev Bras Oftalmol **74**(2): 68-72.

Marsh, S. J., C. E. Stansfeld, D. A. Brown, R. Davey and D. McCarthy (1987). "The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro." Neuroscience **23**(1): 275-289.

Matsumiya, T., A. Sawa and T. Oka (1983). "The effect of capsaicin on C-fiber reflex and heat evoked discharge in the acute spinal cat." Tokai J Exp Clin Med **8**(4): 325-332.

Meng, I. D., B. H. Manning, W. J. Martin and H. L. Fields (1998). "An analgesia circuit activated by cannabinoids." Nature **395**(6700): 381-383.

Mergler, S., M. Valtink, V. J. Coulson-Thomas, D. Lindemann, P. S. Reinach, K. Engelmann and U. Pleyer (2010). "TRPV channels mediate temperature-sensing in human corneal endothelial cells." Exp Eye Res **90**(6): 758-770.

Mergler, S., M. Valtink, S. Takayoshi, Y. Okada, M. Miyajima, S. Saika and P. S. Reinach (2014). "Temperature-sensitive transient receptor potential channels in corneal tissue layers and cells." Ophthalmic Res **52**(3): 151-159.

Midena, E., E. Brugin, A. Ghirlando, M. Sommavilla and A. Avogaro (2006). "Corneal diabetic neuropathy: a confocal microscopy study." J Refract Surg **22**(9 Suppl): S1047-1052.

Montes-Mico, R., A. Cervino, T. Ferrer-Blasco, S. Garcia-Lazaro and D. Madrid-Costa (2010). "The tear film and the optical quality of the eye." Ocul Surf **8**(4): 185-192.

Morgan, C. W., I. Nadelhaft and W. C. de Groat (1978). "Anatomical localization of corneal afferent cells in the trigeminal ganglion." Neurosurgery **2**(3): 252-258.

Nelson, J. D. (1982). "Ocular surface impressions using cellulose acetate filter material. Ocular pemphigoid." Surv Ophthalmol **27**(1): 67-69.

O'Neil, R. G. and S. Heller (2005). "The mechanosensitive nature of TRPV channels." Pflugers Arch **451**(1): 193-203.

Okada, Y., P. S. Reinach, K. Shirai, A. Kitano, W. W. Kao, K. C. Flanders, M. Miyajima, H. Liu, J. Zhang and S. Saika (2011). "TRPV1 involvement in inflammatory tissue fibrosis in mice." Am J Pathol **178**(6): 2654-2664.

Pan, Z., Z. Wang, H. Yang, F. Zhang and P. S. Reinach (2011). "TRPV1 activation is required for hypertonicity-stimulated inflammatory cytokine release in human corneal epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(1): 485-493.

Pan, Z., Z. Wang, H. Yang, F. Zhang and P. S. Reinach (2011). "TRPV1 activation is required for hypertonicity-stimulated inflammatory cytokine release in human corneal epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(1): 485-493.

Pan, Z., H. Yang and P. S. Reinach (2011). "Transient receptor potential (TRP) gene superfamily encoding cation channels." Hum Genomics **5**(2): 108-116.

Pauly, A., M. Meloni, F. Brignole-Baudouin, J. M. Warnet and C. Baudouin (2009). "Multiple endpoint analysis of the 3D-reconstituted corneal epithelium after treatment with benzalkonium chloride: early detection of toxic damage." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(4): 1644-1652.

Pflugfelder, S. C., A. Solomon and M. E. Stern (2000). "The diagnosis and management of dry eye: a twenty-five-year review." Cornea **19**(5): 644-649.

Plant, T. D. and R. Strotmann (2007). "Trpv4." Handb Exp Pharmacol(179): 189-205.

Ramos-Remus, C., M. Suarez-Almazor and A. S. Russell (1994). "Low tear production in patients with diabetes mellitus is not due to Sjogren's syndrome." Clin Exp Rheumatol **12**(4): 375-380.

Reinach, P. S. and K. S. Pokorny (2008). "The corneal epithelium: clinical relevance of cytokine-mediated responses to maintenance of corneal health." Arq Bras Oftalmol **71**(6 Suppl): 80-86.

Reis, A. F. and G. Velho (2002). "Sulfonylurea receptor -1 (SUR1): genetic and metabolic evidences for a role in the susceptibility to type 2 diabetes mellitus." Diabetes Metab **28**(1): 14-19.

Rolando, M., F. Terragna, G. Giordano and G. Calabria (1990). "Conjunctival surface damage distribution in keratoconjunctivitis sicca. An impression cytology study." Ophthalmologica **200**(4): 170-176.

Saika, S. (2007). "Yin and yang in cytokine regulation of corneal wound healing: roles of TNF-alpha." Cornea **26**(9 Suppl 1): S70-74.

Saika, S., S. Kobata, N. Hashizume, Y. Okada and O. Yamanaka (1993). "Epithelial basement membrane in alkali-burned corneas in rats. Immunohistochemical study." Cornea **12**(5): 383-390.

Saika, S., K. Uenoyama, K. Hiroi, H. Tanioka, K. Takase and M. Hikita (1993). "Ascorbic acid phosphate ester and wound healing in rabbit corneal alkali burns: epithelial basement membrane and stroma." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **231**(4): 221-227.

Schafers, M., C. I. Svensson, C. Sommer and L. S. Sorkin (2003). "Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons." J Neurosci **23**(7): 2517-2521.

Schein, O. D., B. Munoz, J. M. Tielsch, K. Bandeen-Roche and S. West (1997). "Prevalence of dry eye among the elderly." Am J Ophthalmol **124**(6): 723-728.

Schein, O. D., J. M. Tielsch, B. Munoz, K. Bandeen-Roche and S. West (1997). "Relation between signs and symptoms of dry eye in the elderly. A population-based perspective." Ophthalmology **104**(9): 1395-1401.

Seifart, U. and I. Strempel (1994). "[The dry eye and diabetes mellitus]." Ophthalmologe **91**(2): 235-239.

Sidhaye, V. K., A. D. Guler, K. S. Schweitzer, F. D'Alessio, M. J. Caterina and L. S. King (2006). "Transient receptor potential vanilloid 4 regulates aquaporin-5 abundance under hypotonic conditions." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(12): 4747-4752.

Sommer, C. and M. Kress (2004). "Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia." Neurosci Lett **361**(1-3): 184-187.

Southall, M. D., T. Li, L. S. Gharibova, Y. Pei, G. D. Nicol and J. B. Travers (2003). "Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes." J Pharmacol Exp Ther **304**(1): 217-222.

Stjarne, P., L. Lundblad, J. M. Lundberg and A. Anggard (1989). "Capsaicin and nicotine-sensitive afferent neurones and nasal secretion in healthy human volunteers and in patients with vasomotor rhinitis." Br J Pharmacol **96**(3): 693-701.

Sullivan, D. A. and J. A. Edwards (1997). "Androgen stimulation of lacrimal gland function in mouse models of Sjogren's syndrome." J Steroid Biochem Mol Biol **60**(3-4): 237-245.

Sullivan, D. A., E. M. Rocha, M. D. Ullman, K. L. Krenzer, J. Gao, I. Toda, M. R. Dana, D. Bazzinotti, L. A. da Silveira and L. A. Wickham (1998). "Androgen regulation of the meibomian gland." Adv Exp Med Biol **438**: 327-331.

Sumioka, T., Y. Okada, P. S. Reinach, K. Shirai, M. Miyajima, O. Yamanaka and S. Saika (2014). "Impairment of corneal epithelial wound healing in a TRPV1-deficient mouse." Invest Ophthalmol Vis Sci **55**(5): 3295-3302.

Szallasi, A. (1994). "The vanilloid (capsaicin) receptor: receptor types and species differences." Gen Pharmacol **25**(2): 223-243.

Szallasi, A. (1995). "Autoradiographic visualization and pharmacological characterization of vanilloid (capsaicin) receptors in several species, including man." Acta Physiol Scand Suppl **629**: 1-68.

Szallasi, A. and P. M. Blumberg (1990). "Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor." Life Sci **47**(16): 1399-1408.

Szallasi, A. and P. M. Blumberg (1990). "Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes." Brain Res **524**(1): 106-111.

Szolcsanyi, J., F. Anton, P. W. Reeh and H. O. Handwerker (1988). "Selective excitation by capsaicin of mechano-heat sensitive nociceptors in rat skin." Brain Res **446**(2): 262-268.

Toda, I., B. D. Sullivan, E. M. Rocha, L. A. Da Silveira, L. A. Wickham and D. A. Sullivan (1999). "Impact of gender on exocrine gland inflammation in mouse models of Sjogren's syndrome." Exp Eye Res **69**(4): 355-366.

Tominaga, M. and M. J. Caterina (2004). "Thermosensation and pain." J Neurobiol **61**(1): 3-12.

Toth, D. M., E. Szoke, K. Bolcskei, K. Kvell, B. Bender, Z. Bosze, J. Szolcsanyi and Z. Sandor (2011). "Nociception, neurogenic inflammation and thermoregulation in TRPV1 knockdown transgenic mice." Cell Mol Life Sci **68**(15): 2589-2601.

Tseng, S. C. and K. Tsubota (1997). "Important concepts for treating ocular surface and tear disorders." Am J Ophthalmol **124**(6): 825-835.

Ufret-Vincenty, C. A., R. M. Klein, M. D. Collins, M. G. Rosasco, G. Q. Martinez and S. E. Gordon (2015). "Mechanism for phosphoinositide selectivity and activation of TRPV1 ion channels." J Gen Physiol **145**(5): 431-442.

Voets, T. (2012). "Quantifying and modeling the temperature-dependent gating of TRP channels." Rev Physiol Biochem Pharmacol **162**: 91-119.

Wakuta, M., N. Morishige, T. Chikama, K. Seki, T. Nagano and T. Nishida (2007). "Delayed wound closure and phenotypic changes in corneal epithelium of the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rat." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(2): 590-596.

Walpole, C. S., S. Bevan, G. Bovermann, J. J. Boelsterli, R. Breckenridge, J. W. Davies, G. A. Hughes, I. James, L. Oberer, J. Winter and et al. (1994). "The discovery of capsazepine, the first competitive antagonist of the sensory neuron excitants capsaicin and resiniferatoxin." J Med Chem **37**(13): 1942-1954.

Wanner, S. P., A. Garami and A. A. Romanovsky (2011). "Hyperactive when young, hypoactive and overweight when aged: connecting the dots in the story about locomotor activity, body mass, and aging in Trpv1 knockout mice." Aging (Albany NY) **3**(4): 450-454.

Watkins, L. R., S. F. Maier and L. E. Goehler (1995). "Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms." Life Sci **57**(11): 1011-1026.

Whitcher, J. P., M. Srinivasan and M. P. Upadhyay (2001). "Corneal blindness: a global perspective." Bull World Health Organ **79**(3): 214-221.

Williams, J. T. and W. Zieglgansberger (1982). "The acute effects of capsaicin on rat primary afferents and spinal neurons." Brain Res **253**(1-2): 125-131.

Wolf, G., D. Livshits, B. Beilin, R. Yirmiya and Y. Shavit (2008). "Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice." Brain Behav Immun **22**(7): 1072-1077.

Wood, J. N., J. Winter, I. F. James, H. P. Rang, J. Yeats and S. Bevan (1988). "Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture." J Neurosci **8**(9): 3208-3220.

Wu, L., X. Gao, R. C. Brown, S. Heller and R. G. O'Neil (2007). "Dual role of the TRPV4 channel as a sensor of flow and osmolality in renal epithelial cells." Am J Physiol Renal Physiol **293**(5): F1699-1713.

Yang, H., Z. Wang, J. E. Capo-Aponte, F. Zhang, Z. Pan and P. S. Reinach (2010). "Epidermal growth factor receptor transactivation by the cannabinoid receptor (CB1) and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) induces differential responses in corneal epithelial cells." Exp Eye Res **91**(3): 462-471.

Yu, F. S., J. Yin, K. Xu and J. Huang (2010). "Growth factors and corneal epithelial wound healing." Brain Res Bull **81**(2-3): 229-235.

Zhang, F., H. Yang, Z. Wang, S. Mergler, H. Liu, T. Kawakita, S. D. Tachado, Z. Pan, J. E. Capo-Aponte, U. Pleyer, H. Koziel, W. W. Kao and P. S. Reinach (2007). "Transient receptor potential vanilloid 1 activation induces inflammatory cytokine release in corneal epithelium through MAPK signaling." J Cell Physiol **213**(3): 730-739.

Zhang, J. M. and J. An (2007). "Cytokines, inflammation, and pain." Int Anesthesiol Clin **45**(2): 27-37.

Zhang, Q., P. Ma, M. Iszard, R. B. Cole, W. Wang and G. Wang (2002). "In vitro metabolism of R(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl]pyrrolo [1,2,3-de]1,4-benzoxazinyl]-(1-naphthalenyl) methanone mesylate, a cannabinoid receptor agonist." Drug Metab Dispos **30**(10): 1077-1086.

Zhivov, A., K. Winter, M. Hovakimyan, S. Peschel, V. Harder, H. C. Schober, G. Kundt, S. Baltrusch, R. F. Guthoff and O. Stachs (2013). "Imaging and quantification of subbasal nerve plexus in healthy volunteers and diabetic patients with or without retinopathy." PLoS One **8**(1): e52157.

Zhou, L., S. Z. Zhao, S. K. Koh, L. Chen, C. Vaz, V. Tanavde, X. R. Li and R. W. Beuerman (2012). "In-depth analysis of the human tear proteome." J Proteomics **75**(13): 3877-3885.

Ziegler, D., N. Papanas, A. Zhivov, S. Allgeier, K. Winter, I. Ziegler, J. Bruggemann, A. Strom, S. Peschel, B. Kohler, O. Stachs, R. F. Guthoff, M. Roden and G. German Diabetes Study (2014). "Early detection of nerve fiber loss by corneal confocal microscopy and skin biopsy in recently diagnosed type 2 diabetes." Diabetes **63**(7): 2454-2463.

Zoukhri, D. (2006). "Effect of inflammation on lacrimal gland function." Exp Eye Res **82**(5): 885-898.

8. 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 n° ***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