UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FMRP- USP

Jacqueline Ferreira Faustino Barros

Avaliação do filme lacrimal e da superfície ocular em modelos animais de olho seco

Ribeirão Preto

2021

Jacqueline Ferreira Faustino Barros

Avaliação do filme lacrimal e da superfície ocular em modelos animais de olho seco

Versão corrigida

Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-graduação

Tese apresentada ao Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Para obtenção do título de Doutor em ciências.

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

Orientador: Profº Dr. Eduardo Melani Rocha

Ribeirão Preto

2021

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

Faustino Barros, Jacqueline Ferreira

Avaliação do filme lacrimal e da superfície ocular em modelos animais de olho seco. Jacqueline Ferreira Faustino Barros.- Ribeirão Preto- SP, 2021.

65 p.:1il;30 cm

Tese de Doutorado Direto, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Áudio Vestibular.

Orientador: Profº. Dr. Eduardo Melani Rocha

1. Olho seco; 2. Unidade funcional lacrimal; 3. Doenças metabólicas.

Nome: Jacqueline Ferreira Faustino Barros

Título: **Avaliação do filme lacrimal e da superfície ocular em modelos animais de olho seco.**

Tese apresentada ao Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Para obtenção do título de Doutor em ciências.

Aprovado em: _____/____/_____

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Te Deum laudámus,

A minha eterna gratidão e amor a família que formei com meu esposo Paulo R. B. Barros Filho, sempre será meu amor eterno e porto seguro. Aos nossos filhos João Paulo e Luis Maria. Obrigada por toda compreensão e amor durante esta jornada.

Gostaria de agradecer aos meus pais Alessandra e Renato Faustino, que me deram a fé, uma família unida, amorosa e por nos educar com tanta dedicação. Me orgulho muito de vocês.

Ao meu irmão Pedro Faustino, pelos bons conselhos, ajuda e motivação.

Aos meus Avós Antônio e Aparecida Faustino (*in memoriam*), a José Jerusalém e Maria Dolores Ferreira, obrigada por serem um exemplo de amor, fidelidade, fé e dedicação.

Agradeço em especial a minha sogra Maria Júlia Lucena,

Aos meus cunhados Juliana e Cassiano Damasceno, Gerson e Camila Barros,

meus amados sobrinhos Cássio, Júlia, Maria Carolina, e Valentina.

Obrigada meu Deus por capacitar seus filhos, todo esforço e empenho são dedicados a Ti.

Agradecimentos

Agradeço de maneira especial ao meu orientador, Prof. Eduardo Melani Rocha, que desde a fase de iniciação científica contribui para meu aprendizado, desenvolvimento pessoal e profissional, e por ter sido um bom mentor durante toda a pós-graduação.

A todas as amigas e amigos da casa 19, em especial as técnicas: Adriana de Andrade Batista Murashima, Marina Zilio Fantucci e Lilian Eslaine da Silva, pela amizade e ajuda impagáveis. As colegas de laboratório: Carolina M. Módulo, Lara Dias, Ariane Santana, Amanda Barbosa, Regina Pontelli, Leidiane Adriano. Aos alunos de pré-Iniciação científica que sempre estiveram dispostos e me ensinaram a ensinar.

Aos docentes João Marcelo F. Furtado, Jayter Silva de Paula, Edwin Tamashiro, Maria de Lourdes Veronese Rodrigues, por todos os momentos de ajuda e aprendizado.

Aos técnicos do Biotério da clínica médica e do prédio multidisciplinar, ao Professor Alceu Jordão e a Andrea Leoni.

Aos funcionários do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Denny Marco Garcia, Edson Lúcio Beragua, Rogério A. M. Castania, Maria Cecília Onofre, Rita A. Diegues.

A Universidade de São Paulo, a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e a secção de pós-graduação.

Suporte Financeiro

O estudo desenvolvido nesta tese recebeu apoio financeiro das seguintes instituições governamentais brasileiras:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Processo nº: 140882/2016-2. (Bolsa de Doutorado Direto)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Código 001.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

Processos nº: 2015/20580-7, 2014/22451-7 e 2014/23211-0.

Núcleo de Pesquisa em Fisiopatologia e Terapia Ocular da Universidade de São Paulo - NAP-FTO.

Processo no 12.1.25431.01.7.

"O céu e a terra, o tempo e a eternidade coexistem no mais íntimo do meu ser. O tempo passa, mas nem tudo passa com o tempo. Eu não passo, o meu eu não envelhece, antes pelo contrário, aproxima-se da juventude eterna de Deus"

Os Três Sois, Antonio Orozco, Editora quadrante.

Faustino-Barros, JF. Avaliação do filme lacrimal e da superfície ocular em modelos animais de olho seco. Ribeirão Preto – SP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a superfície ocular (SO) de modelos animais com a doença do olho seco (DOS) em doenças metabólicas e uso crônico de cloreto de benzalcônio. E compara-los ao grupo controle (CG) em critérios funcionais, histológicos e moleculares. **Métodos**: Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando 220-250g, induzidos para: a) Diabetes mellitus (DM) por injeção intravenosa única de estreptozotocina a 60 mg/kg, e alojados durante 8 semanas em biotério; b) Hipotireoidismo (HT) induzidos com metimazol 500 mg/l diluído na água de bebedouro, durante 5 semanas); c) Uso crônico de cloreto de benzalcônio (BAK)instilação tópica ocular de colírio com BAK a 0,2% duas vezes ao dia, durante 7 dias. Estes foram comparados com ratos CG pareados por idade e sexo (n=10/em cada grupo de estudo). Avaliação funcional: teste de fenol vermelho, coloração de fluoresceína, teste de sensibilidade através de capsaicina 10µM, osmolariadade do filme lacrimal e sanguínea. Avaliação histológica da glândula lacrimal (GL) e córnea (CO) avaliando a espessura do epitélio. Avaliação molecular de expressão relativa de mRNA pelo método de qPCR em tempo real utilizado para comparar a expressão de *Il1 beta, Il6, Mmp9 e Tnf alfa* na CO, GL, e gânglio do trigêmeo (GT). E ainda, marcadores de reparação tecidual *Bmp7, Fgf10, Runx1, Runx3 e Smad1* em GL. Além de receptor TRPV1 em CO. E ainda utilizamos a avaliação de estresse oxidativo da catalase e glutationa oxidada (GSSG) por métodos fluorimétricos na GL. **Resultados**: O grupo DM apresentou menor fluxo lacrimal e maior osmolaridade sanguínea (p=0,02 e p<0,001 respectivamente); Maior atividade da catalase na GL (p<0,001); Menor expressão de TRPV1 na CO (p=0,03), maior expressão de *Il1b* e *Il6* em GL e GT (p=0,03 e p=0,03), menor expressão de *Runx1* GL (p=0,02). O grupo HT apresentou maior osmolaridade lacrimal (p<0,001); Maior atividade da catalase na GL (p=0,02); apresentou expressão reduzida de *Mmp9* no CO (p< 0,001), maior expressão de *Runx3* na GL (p=0,01) e maior expressão de *Il1b* no GT (p = 0,004). O grupo BAK apresentou maior sensibilidade ao teste pata olho (p=0,001) maior osmolaridade sanguínea (p=0,001); E ainda, menor espessura do epitélio da CO (P<0,001); Maior expressão

de *Il1b, Il6* na GL (p=0,001 e p=0,03 respectivamente) e menor expressão de *Mmp9 e Runx3* (p=0,009 e p=0,009); Maior expressão de *Il1b e Tnfa* no GT (p=0,01 e p=0,04). **Conclusões**: Nossos modelos de estudo da DOS causaram mudanças em toda unidade funcional lacrimal. Nos DM levaram a perda de sensibilidade e inflamação na SO e GT. No grupo HT, inflamação na SO e GT e aumento nos mediadores de reparação tecidual da GL. E o BAK, hiperestesia na SO e inflamação na GL e GT. Nós esperamos que estas observações possam contribuir em estudos futuros em possíveis diagnósticos e tratamentos para DOS.

Palavras chaves: Olho seco, Diabetes Melittus, Hipotireoidismo, qPCR, citocinas inflamatórias, citocinas de reparação tecidual.

Faustino-Barros, JF. Evaluation of tear film and ocular surface in animal models with dry eye. Ribeirão Preto - SP: Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, 2021.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the ocular surface (OS) of animal models with dry eye disease (DES) in metabolic diseases and chronic use of benzalkonium chloride. And compare them to the control group (CG) on functional, histological and molecular criteria. **Methods:** Male *Wistar* rats, weighing 220-250g, were used for: a) Diabetes mellitus (DM) by single intravenous injection of streptozotocin at 60 mg/kg, and housed for 8 weeks in a vivarium; b) Hypothyroidism (HT) induced with methimazole 500 mg/l diluted in drinking water for 5 weeks); c) Chronic use of benzalkonium chloride (BAK) topical eye drop with 0.2% BAK twice daily for 7 days. These were compared with CG rats matched for age and sex (n = 10/in each study group). Functional evaluation: red phenol test, fluorescein staining, sensitivity test using 10 µM capsaicin, tear film and blood osmolariability. Histological evaluation of the lacrimal gland (GL) and cornea (CO) evaluating the thickness of the epithelium. Molecular evaluation of relative mRNA expression by the real-time qPCR method used to compare the expression of *Il1 beta, Il6, Mmp9 and Tnf alpha* in CO, GL, and trigeminal ganglion (GT). Also, tissue repair markers *Bmp7, Fgf10, Runx1, Runx3* and *Smad1* in GL. In addition to TRPV1 receptor in CO. And we also used the oxidative stress assessment of catalase and oxidized glutathione (GSSG) by fluorimetric methods in GL. **Results:** The DM group had lower tear flow and greater blood osmolarity ($p = 0.02$ and $p < 0.001$ respectively); Greater activity of catalase in GL ($p < 0.001$); Lower expression of TRPV1 in CO ($p = 0.03$), higher expression of Il1b and Il6 in GL and GT ($p = 0.03$ and $p = 0.03$), lower expression of Runx1 GL ($p = 0.02$). The HT group showed greater lacrimal osmolarity ($p < 0.001$); Greater activity of catalase in GL ($p = 0.02$); showed reduced expression of Mmp9 in CO ($p < 0.001$), higher expression of Runx3 in GL ($p = 0.01$) and higher expression of Il1b in GT ($p = 0.004$). The BAK group showed greater sensitivity to the eye test ($p = 0.001$) greater blood osmolarity ($p = 0.001$); Also, less thickness of the CO epithelium ($P < 0.001$); Higher expression of Il1b, Il6 in the GL ($p = 0.001$ and $p =$

0.03 respectively) and lower expression of Mmp9 and Runx3 ($p = 0.009$ and $p = 0.009$); Higher expression of Il1b and Tnfa in the TG ($p = 0.01$ and $p = 0.04$). **Conclusions**: Our DOS study models caused changes in the entire lacrimal functional unit. In DM, they led to loss of sensitivity and inflammation in the OR and GT. In the HT group, inflammation in the SO and GT and an increase in the tissue repair mediators of the GL. In addition, BAK, hyperesthesia in the OS and inflammation in the GL and GT. We hope that these observations can contribute to future studies on possible diagnoses and treatments for DOS.

Key words: Dry eye, Diabetes Melittus, Hypothyroidism, qPCR, inflammatory cytokines, repair cytokines.

Lista de Figuras

Figura 1 – Fisiopatologia da doença do olho seco (DOS). Ciclo vicioso que alimenta a inflamação na superfície ocular. Adaptado de: (BRON; DE PAIVA; CHAUHAN; BONINI et al., 2017). Pág.20

Figura 2 - Diagrama do modelo experimental utilizado no estudo. Grupo controle com n=10 animais, sendo o mesmo para todos os grupos, com tempo de permanência no biotério de estudo de 4 semanas. Grupo diabetes (DM) com n=10 animais, com tempo de indução da doença de 8 semanas. Grupo Hipotireoideo (HT), n=10 animais, com tempo de indução da doença de 5 semanas. Grupo cloreto de benzalcônio (BAK), n=10 animais, com tempo de indução da doença de 1 semana. Pág.31

Figura 3 - Exames clínicos funcionais. A) O resultado do teste pata olho (dado em movimentos da pata ao olho direito por minuto) após o recebimento de um colírio de capsaicina (CAP) 10 µM. Nesse teste o grupo BAK apresentou maior frequência de movimentos compatíveis com hiperalgesia (P = 0,001). B) Teste de fenol vermelho: dado em milímetros do fio de barbante molhado pelas lágrimas em 30 segundos, onde DM apresentou menores médias de fluxo lacrimal (P= 0,02). C) Avaliação da osmolaridade do filme lacrimal, através do aparelho Tear Lab®. O grupo HT apresentou um filme lacrimal hiperosmolar em relação ao CG (P<0,001). D) avaliação da osmolaridade sanguínea feita através do ponto de congelamento do plasma. Os grupos DM e BAK apresentaram hiperosmolaridade sanguínea quando comparados ao CG (P<0,001 e P=0,001 respectivamente). Foram utilizados n=10 ratos por grupo, e a análise estatística aplicou o teste U de Mann-Whitney. Pág.38

Figura 4 - Exame da lâmpada de fenda. Imagens do olho direito dos grupos experimentais obtidos através da lâmpada de fenda no dia da eutanásia. A) Grupo controle (CG); B) Grupo Diabetes Melittus (DM); C) Grupo Hipotireoidismo (HT); D) Grupo cloreto de benzalcônio Pág.39

(BAK). Todas imagens tiradas em lâmpada de fenda com luz incandescente e azul de cobalto, utilizando colírio de fluoresceína sódica.

Figura 5 - Espessura do epitélio da córnea. Dados obtidos de cortes histológicos da córnea do olho direito de cada grupo. Estas foram medidas em três secções do epitélio somadas e divididas para o cálculo da média de cada olho por animal. O grupo BAK apresentou diferença significativa em relação ao CG Foram utilizados n=10 ratos por grupo, e a análise estatística aplicou o teste U de Mann-Whitney. Pág.40

Figura 6 - Cortes histológicos da córnea. Imagens do olho direito dos grupos experimentais obtidos através da coloração de H&E no dia da eutanásia. A) Grupo controle (CG); B) Grupo Diabetes Melittus (DM); C) Grupo Hipotireoidismo (HT); D) Grupo cloreto de benzalcônio (BAK). Fotografadas em microscópio eletrônico com magnificência de 20x. Pág.40

Figura 7 - Cortes histológicos da glândula lacrimal. Imagens da glândula lacrimal do lado direito dos grupos experimentais obtidos através da coloração de H&E no dia da eutanásia. A) Grupo controle (CG); B) Grupo Diabetes Melittus (DM); C) Grupo Hipotireoidismo (HT); D) Grupo cloreto de benzalcônio (BAK). Fotografadas em microscópio eletrônico com magnificência de 20x. Pág.41

Figura 8 - Expressão relativa de mRNA para receptores de *TRPV1* na CO. Obtido em unidades arbitrárias (n=10/animais por grupo). O grupo DM apresentou menor expressão relativa quando comparado ao CG (P=0,03). Análise estatística aplicou o teste U de Mann-Whitney. Pág.42

Figura 9 - Expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias por qPCR na CO. Análise de *Il1b, Il6, Mmp9 e Tnf* por qPCR na CO (expresso em unidades arbitrárias, normalizadas por mRNA de β-actina). C) O grupo HT apresentou diferença significativa em relação ao CG (P<0,001) na citocina *Mmp9* (n=10/animais por grupo). A análise estatística aplicou o teste U de Mann-Whitney. Pág.43

Figura 10 - Expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias por qPCR na GL. Análise de *Il1b, Il6, Mmp9 e Tnf* por qPCR na GL (expresso em unidades arbitrárias, normalizadas por mRNA de β-actina). A) O grupo BAK e o DM apresentou maior expressão relativa Pág.44

de RNAm de *Il1b* (P<0,001 e P=0,03 respectivamente). B) Somente o grupo BAK mostrou aumento de *Il6* (P=0,03). C) BAK apresentou diminuição de *Mmp9* (P=0,009). A análise estatística aplicou o teste U de Mann-Whitney.

Figura 11 - Expressão relativa de mRNA de citocinas pró-mitóticas na GL. Análise de *Bmp7, Fgf10, Smad1, Runx1 e Runx3* por qPCR na GL (expresso em unidades arbitrárias, normalizadas por mRNA de β-actina). D) O grupo DM mostrou diminuição da expressão relativa de *Runx1* (P=0,02). E) O grupo HT aumento da expressão relativa de *Runx3* (P=0,01), o BAK diminuição desta citocina (P=0,009). A análise estatística aplicou o teste U de Mann-Whitney. Pág. 45

Figura 12 - Expressão relativa de mRNA de citocinas pró-inflamatórias de *Il1b, Il6, Mmp9 e Tnf* por qPCR na GT (expresso em unidades arbitrárias, normalizadas por mRNA de β-actina). O grupo BAK e o HT apresentou maior expressão relativa de RNAm de *Il1b* (P=0,01 e P=0,004 respectivamente). E ainda, o grupo DM mostrou aumento de *Il6* (P=0,02), e o grupo BAK aumento de *Tnf* (P=0,04) (n=10 animais por grupo). A análise estatística aplicou o teste U de Mann-Whitney. Pág.46

Figura 13 - Avaliação do Stress oxidativo na GL. A) Atividade da Catalase na GL medido em mU/ml, o grupo DM apresentou resultado significativo (P<0,001) demonstrando maior atividade da catalase em relação ao CG; O grupo HT apresentou diferença significativa em relação ao CG (P=0,02). B) Ensaio fluorimétrico de Glutationa (GSSG), mensurado pelo espectrofotômetro e convertido para µg/ml. Não houve diferença significativa entre os grupos de estudo (n=10/animais por grupo). Pág.47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação de Sondas usadas no qPCR em tempo real	Pág. 35
Tabela 2 -	Resumo com os resultados obtidos em cada grupo analisado	Pág. 48

LISTA DE ABREVIATURAS

DOS	Doença do olho seco
DM	Grupo de ratos com diabetes mellitus
HT	Grupo de ratos com hipotireoidismo
BAK	Grupo de ratos induzidos a olho seco por cloreto de benzalcônio
CG	Grupo controle
UFL	Unidade funcional lacrimal
GL	Glândula lacrimal
SO	Superfície ocular
CO	Córnea
GT	Gânglio do trigêmeo
IL1B	Interleucina tipo 1 beta
IL6	Interleucina 6
TNFA	Fator de necrose tumoral alfa
MMP9	Metaloproteinases de matriz extracelular 9
QPCR	Reação em cadeia da Polimerase quantitativo em tempo real
BMP7	Proteína morfogênica óssea 7
FGF10	Fator de crescimento de fibroblasto 10
RUNX1	Fator de transcrição 1 relacionado ao runt
RUNX3	Fator de transcrição 3 relacionado ao runt
SMAD1	Membro da família de proteínas Smad
TRPV1	Receptor vanilóide 1. Receptor de capsaicina
OSAD	Olho seco aquoso deficiente
OSE	Olho seco evaporativo
T3	Hormônio triiodotironina
T4	Tiroxina
TSH	Hormônio estimulador da tireoide
CAP	Capsaicina
GSSG	Dissulfeto de glutationa ou glutationa oxidada

Sumário

1.0 Introdução 16

2.0 Referencial teórico 19

2.1 Doença do olho seco 20

2.1.1 Fisiologia da Superfície ocular e Sintomas da DOS 21

2.1.2 Diagnóstico 22

2.2 Diabetes mellitus 22

2.2.1 Diabetes e DOS 23

2.3 Hipotireoidismo 24

2.3.1 Hipotireoidismo e DOS 25

2.4 Conservantes de colírios oftálmicos 25

2.5 Justificativa do estudo 26

3.0 Objetivos 27

3.1 Objetivos específicos 28

4.0 Material e métodos 29

4.1 Modelo do estudo 30

4.2 Avaliação funcional 32

4.3 Histologia 33

4.4 PCR quantitativo em tempo Real 34

4.5 Enzimas antioxidantes e produtos de estresse oxidativo 35

4.6 Análise estatística 36

5.0 Resultados 37

5.1 Avaliação funcional 38

5.2 Histologia 39

5.3 qPCR em tempo Real 42

5.4 Dosagem de enzimas e produtos de estresse oxidativo ... 47

6.0 Discussão 49

7.0 Conclusão 54

8.0 Referências 56

9.0 Anexos da tese 62
9.1 Aprovação do Comitê de ética local 62
9.2 Tabela com dados colhidos 63

Introdução

1. Introdução

As doenças metabólicas e seus mecanismos fisiopatológicos podem levar a doença do olho seco (DOS), que podem causar redução visual, e colocar em risco a integridade ocular. Atualmente, a DOS é reconhecida como a doença ocular mais prevalente no mundo, no entanto, não existem exames que apresentem um denominador comum em seu diagnóstico na prática clínica ou em estudos clínicos (CLAYTON, 2018).

O Diabetes Mellitus (DM) e o Hipotireoidismo (HT) são exemplos de doenças metabólicas sistêmicas que podem causar a DOS, e de interesse neste estudo. E também colírios com conservantes tóxicos, que com uso contínuo levam a DOS, como o cloreto de benzalcônio (BAK). A fim, de investigar melhor a DOS nestas doenças, utiliza-se a unidade funcional lacrimal (UFL) para compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos (Stern, Gao et al. 2004). A UFL é composta por: glândula lacrimal (GL); a superfície ocular (SO), córnea (CO), conjuntiva, glândulas meibomianas, pálpebras, nervos sensoriais, e que estão integradas ao gânglio do trigêmeo (GT) e nervos eferentes que trazem informações autonômicas.

A UFL mantém a SO saudável por meio da secreção adequada do filme lacrimal, em termos de volume e conteúdo, garantindo proteção, lubrificação e renovação das células epiteliais da CO, respondendo a influências ambientais, neurais e hormonais (BRON; DE PAIVA; CHAUHAN; BONINI *et al.*, 2017; WILLCOX; ARGUESO; GEORGIEV; HOLOPAINEN *et al.*, 2017). O dano ou doença de qualquer componente da UFL pode desestabilizar o filme lacrimal e levar a DOS (STERN; GAO; SIEMASKO; BEUERMAN *et al.*, 2004; STERN; PFLUGFELDER, 2017).

No Brasil, a prevalência da DOS varia de 11,2% a 19% de pessoas, de acordo com a região demográfica (CASTRO; SELEGATTO; CASTRO; MIRANDA *et al.*, 2018). No mundo a prevalência é em torno de 10 a 20% variando de acordo com os critérios de diagnóstico para olho seco. (STAPLETON; ALVES; BUNYA; JALBERT *et al.*, 2017)

Nos Estados Unidos, a ampla prevalência de DOS impõe uma carga econômica substancial aproximada de US$ 3,8 bilhões de dólares em gastos com saúde anualmente. E a cada ano, os custos sociais associados a essa condição

crônica chegam a aproximadamente US$ 55 bilhões nos Estados Unidos(CLAYTON, 2018). Este cenário, motivou estudos afim de entender melhor os mecanismos fisiopatológicos desta doença, dado que os principais fatores de risco como uso de dispositivos eletrônicos como celulares, televisores e computadores por mais de 6 horas diárias, DM, menopausa, uso de antidepressivos, e cirurgias oculares estão diretamente ligados com a longevidade populacional. Bem como o aumento da tecnologia no cotidiano e nos postos de trabalho, além do maior acesso aos cuidados de saúde. (UCHINO; SCHAUMBERG; DOGRU; UCHINO *et al.*, 2008)

Apesar de diferentes estímulos desafiarem a SO de maneira distinta, uma das hipóteses deste estudo é que ocorra um ciclo vicioso em toda UFL, levando à disfunção da secreção de lágrimas e indução de um ambiente inflamatório.

No entanto, a pergunta que fica é quais as semelhanças que estas distintas condições provocam na DOS, existem sinais clínicos que são iguais? E marcadores moleculares? Como os achados clínicos e moleculares estão correlacionados?

Referencial teórico

2.Referencial teórico

2.1 Doença do olho seco

A doença do olho seco (DOS) foi redefinida em 2017 após conferências internacionais de especialista da área, e o olho seco se caracteriza por uma doença multifatorial da superfície ocular associada a uma perda da homeostase do filme lacrimal e acompanhada por sintomas oculares, nos quais a instabilidade e hiperosmolaridade do filme lacrimal, inflamação e dano da superfície ocular e anormalidades neurossensoriais desempenham papéis etiológicos (BRON; DE PAIVA; CHAUHAN; BONINI *et al.*, 2017). Assim, a DOS foi classificada e subdividida em dois grupos: olho seco aquoso deficiente (OSAD) e olho seco evaporativo (OSE).

O primeiro OSAD teria como gatilho a hiperosmolaridade, resultando em uma secreção lacrimal reduzida na presença de uma taxa normal de evaporação da lágrima. Já o segundo OSE, seria o resultado de uma evaporação excessiva do filme lacrimal. Apesar de, parecerem vias distintas a DOS iniciada por uma ou outra via, acaba em uma cadeia de eventos inflamatórios, que criam um círculo vicioso que perpetua o estado DOS (BRON; DE PAIVA; CHAUHAN; BONINI *et al.*, 2017).

Figura 1. Fisiopatologia da doença do olho seco (DOS). Ciclo vicioso que alimenta a inflamação na superfície ocular. Adaptado de (BRON; DE PAIVA; CHAUHAN; BONINI *et al.*, 2017).

O ciclo vicioso de inflamação da SO devido a hiperosmolaridade causada por eventos sistêmicos como a deprivação hormonal do DM e dos hormônios

tireoidianos, além do uso crônico de colírios irritativos. Podem levar a disfunção da glândula lacrimal (GL) induzindo inflamação, diferenciação anormal e perda acelerada de células epiteliais da superfície ocular, instabilidade do filme lacrimal devido à ausência do glicocálice produzido por essas células (BRON; DE PAIVA; CHAUHAN; BONINI *et al.*, 2017).

Os tecidos presentes na UFL apresentam altos níveis de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas interleucina tipo 1 beta (Il1β), e fator de necrose tumoral alfa (Tnfα); e quimiocinas, bem como metaloproteinases de matriz extracelular (Mmp9) (MESSMER, 2015). Todos bem descritos na literatura e amplamente utilizados como marcadores nos tecidos alvos, no entanto, ainda não foram amplamente explorados como marcadores diagnóstico e nem utilizados para categorizar gravidade tanto em modelos animais quanto em humanos. (KLOOSTERBOER; DERMER; GALOR, 2019)

2.1.1 Fisiologia da Superfície ocular e Sintomas da DOS

O filme lacrimal é composto por três camadas: a primeira camada lipídica (secretada pelas glândulas de meibomius), a segunda aquosa secretada pela glândula lacrimal, e a terceira de mucinas (secretada pela conjuntiva, córnea, glândula lacrimal e outras estruturas). Juntas, as três camadas são responsáveis por manter a superfície ocular saudável em resposta as condições de homeostase e ambientais. (BRON; TOMLINSON; FOULKS; PEPOSE *et al.*, 2014)

Os primeiros sinais da DOS são: desconforto visual, dor incapacitante, visão flutuante, limitação das atividades da vida diária como leitura, assistir televisão, uso de telas de computador e celulares, e direção de veículos. Estes pioram em ambientes adversos com baixa umidade, uso de lentes de contato, e que podem variar em intensidade e gravidade de acordo com o indivíduo.(CLAYTON, 2018)

Na avaliação clínica da DOS os achados estão relacionados a instabilidade do filme lacrimal e sua ruptura; epitélio rugoso nas regiões onde o filme lacrimal se rompe; sintomas de desconforto ocular devido a hiperosmolaridade; lubrificação reduzida por baixo volume lacrimal, perda celular e ceratites; mediadores

inflamatórios e fatores neurosensoriais e centrais. (BRON; DE PAIVA; CHAUHAN; BONINI *et al.*, 2017; BRON; TOMLINSON; FOULKS; PEPOSE *et al.*, 2014).

2.1.2 Diagnóstico

Durante a avaliação feita pelo oftalmologista o principal relato ou queixa é de desconforto visual ou corpo estranho nos olhos, embasamento ou acuidade visual reduzida, e que podem ser inferidos através de questionários como OSDI (*OCULAR SURFACE INDEX*) sendo o escore do questionário >20 considerado olho seco e necessário positividade em 1 ou mais dos exames listados abaixo:

a) Tempo de Ruptura do filme lacrimal (TRFL) < de 10 segundos;

b) Coloração de lisamina ou rosa bengala, a intensidade da coloração e o padrão de distribuição do corante são avaliados semi-quantitativamente. A coloração na área da fissura da pálpebra sugere olho seco. Vários índices estão disponíveis para a avaliação da coloração, como o índice de *van Bijsterveld*, a *Oxford Grading Scale* e o esquema *CLEK*, sendo >3 caracterizado como olho seco;

c) Teste de Schirmer, onde valores menores que 5mm em 5 minutos são considerados olho seco;

d) Avaliação das glândulas meibomius a fim de avaliar oclusão de ductos.(MESSMER, 2015)

Avanços em diagnóstico e novas formas de avaliação vem sendo estudas como testes de avaliação de sensibilidade, osmolaridade lacrimal, stress oxidativo, e utilização de citocinas. (KLOOSTERBOER; DERMER; GALOR, 2019)

2.2 Diabetes mellitus

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica caracterizada pela falta de insulina ou resistência à sua ação periférica, resultando em hiperglicemia. A hiperglicemia crônica e o comprometimento metabólico podem levar a uma variedade de complicações, como neuropatia periférica, diminuição nos níveis de

insulina, microvasculopatias, nefropatia e retinopatia, além de aumentar o risco de doença cardiovascular (ACHTSIDIS; ELEFTHERIADOU; KOZANIDOU; VOUMVOURAKIS *et al.*, 2014; COUSEN; CACKETT; BENNETT; SWA *et al.*, 2007; RAMOS-REMUS; SUAREZ-ALMAZOR; RUSSELL, 1994).

A insulina é crítica para a proliferação das células acinares da GL e células epiteliais da córnea. Foi demonstrado que a hiperglicemia induz alterações histológicas na glândula lacrimal, sugerindo o papel do estresse oxidativo induzido por diabetes no DOS (GALOR; MOEIN; LEE; RODRIGUEZ *et al.*, 2018; ZHANG; ZHAO; DENG; SUN *et al.*, 2016)

A prevalência mundial do DM é de 9,3% da população. A prevalência do diabetes no Brasil é de 6,6 a 9,4%, variando de acordo com os critérios de diagnóstico. O Brasil está em 8ª lugar mundial de prevalência da DM. Resultando em um alto custo com tratamentos médicos e mortes de idosos, sendo a sétima maior causa no mundo (ZHANG; ZHAO; DENG; SUN *et al.*, 2016; ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001)

O DM foi identificado como um dos principais fatores de risco sistêmicos para DOS. Estudos sugerem que 54% de diabéticos apresentem DOS, e havendo uma correlação significativa entre DOS e tempo de DM, diretamente relacionados aos níveis de hemoglobina glicada e o controle da doença. Apontando que os exames da superfície ocular deveriam ser de rotina assim como os de fundo de olho nestes pacientes.(ZHANG; ZHAO; DENG; SUN *et al.*, 2016)

2.2.1 Diabetes e DOS

Em pacientes diabéticos os parâmetros do filme lacrimal são alterados, como o tempo de ruptura do filme lacrimal e sua secreção, e maior queixa e duração de sintomas da DOS. A redução da estabilidade do filme lacrimal e tempo são provavelmente devido à redução da produção de mucina pelas células caliciformes. Evidências sugerem que a densidade das células caliciformes é dependente da inervação da córnea, e foram observadas reduções na inervação da córnea que levaram a redução da função das células caliciformes.(COUSEN;

CACKETT; BENNETT; SWA *et al.*, 2007; FUERST; LANGELIER; MASSARO-GIORDANO; PISTILLI *et al.*, 2014)

Assim, os sinais e sintomas de DOS se correlacionam com o grau e estágio do próprio DM em cada indivíduo, pois a neuropatia periférica e a gravidade da retinopatia diabética são fatores que podem contribuir para: redução da produção de lágrimas, o dano microvascular à GL por hiperglicemia, redução da inervação lacrimal por neuropatia autonômica, redução do suporte trófico ao tecido lacrimal e redução do lacrimejamento reflexo devido ao comprometimento da sensibilidade corneana.(BRON; DE PAIVA; CHAUHAN; BONINI *et al.*, 2017)

2.3 Hipotireoidismo

A glândula tireoide produz os hormônios triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), que regulam o metabolismo energético. A função da glândula tireoide é controlada pela glândula hipófise. Esta produz o hormônio estimulador da tireoide (TSH), que induz a tireoide a produzir T3 e T4.(CHAKER; BIANCO; JONKLAAS; PEETERS, 2017; ISKELELI; KARAKOC; ABDULA, 2008)

A definição de hipotireoidismo é a deficiência do hormônio tireoidiano (T3 livre). O seu diagnóstico é predominantemente bioquímico devido à grande variação de sintomas. Assim, o hipotireoidismo primário (evidente) ou clínico seriam altas concentrações do hormônio estimulador da tireoide (TSH), e concentrações de tiroxina livre (T3 forma ativa do hormônio) abaixo do intervalo de referência.(CHAKER; BIANCO; JONKLAAS; PEETERS, 2017)

As manifestações clínicas de hipotireoidismo podem variar de risco de vida a nenhum sinal ou sintoma. Sendo os mais comuns em adultos: fadiga, letargia, intolerância ao frio, ganho de peso, constipação, alteração na voz e pele seca. Podendo variar com a idade, o sexo, entre outros fatores.(BURMAN, 2012)

De acordo com os dados epidemiológicos, a prevalência no continente norte americano chega a 7% da população. Já no continente Europeu varia entre 0-5% de casos evidentes e leves. Afetando na sua maioria mulheres, idosas e da raça branca, sendo mais comum em pessoas que já possuem alguma doença autoimune.(BENSENOR, 2019) Outro fato relevante, é de que este hormônio é

dependente de iodo, e portanto nas populações que utilizam a suplementação deste mineral quanto nas que tem carência severa há uma alta prevalência das desordens relacionadas aos hormônios tireoidianos. (CHAKER; BIANCO; JONKLAAS; PEETERS, 2017)

2.3.1 Hipotireoidismo e DOS

A orbitopatia associada à tireoide é um distúrbio inflamatório autoimune que afeta a gordura orbital, músculos extra-oculares e a glândula lacrimal, que resulta na expansão do tecido por deposição e edema de glicosaminoglicanos e, em alguns casos, fibrose pela produção de colágeno.(PARK; KIM; LEE; PARK *et al.*, 2018)

Estes pacientes apresentam envolvimento da glândula lacrimal e redução na produção de lágrimas, retração da pálpebra ocular, fenda palpebral anormalmente ampla, fechamento palpebral insuficiente, proptose, piscar reduzido e fenômeno de Bell prejudicado. A soma dos fatores mencionados contribui para maior evaporação do filme lacrimal.(ALANAZI; ALOMRAN; ABUSHARHA; FAGEHI *et al.*, 2019; DIAS, A.; MODULO, C.; JORGE, A.; BRAZ, A. *et al.*, 2007)

2.4 Conservantes de colírios oftálmicos

O cloreto de benzalcônio (BAK) é um composto de amônio quaternário, que age como um detergente, amplamente utilizado como agente desinfetante, antibacteriano, antifúngico e eficaz no combate ao crescimento de microrganismos patogênicos. Além disso, seu uso tem sido um requisito em recipientes multidose por muitas autoridades regulatórias desde a década de 1970. O BAK tem sido usado na oftalmologia desde a década de 1940(BARABINO; ANTONELLI; CIMBOLINI; MAURO *et al.*, 2014; BAUDOUIN; LABBE; LIANG; PAULY *et al.*, 2010; FOULKS, 2011). Este é o conservante mais comum, encontrado em aproximadamente 70% dos colírios. E pode ser usado em diferentes concentrações que variam de 0,004% a 0,02%. (STEVEN; ALAGHBAND; LIM, 2018).

Acreditava-se que o efeito detergente do BAK poderia ser necessário para a penetração do ingrediente ativo das formulações oftálmicas. No entanto, estudos ao longo dos anos vem demonstrando os efeitos tóxicos também para as células epiteliais da superfície ocular, como inflamação danos aos nervos da córnea o que levaria a médio/longo prazo a doença do olho seco devido ao uso continuo de colírios contendo este conservante. (NOECKER; MILLER, 2011; NORLINA RAMLI, 2015; VITOUX; KESSAL; MELIK PARSADANIANTZ; CLARET *et al.*, 2020)

O uso crônico de medicamentos tópicos, como os colírios para o tratamento do glaucoma, aliados a toxicidade dos conservantes entre eles o BAK, foram reconhecidos como causas da DOS (XIONG; CHEN; LIU; LIU *et al.*, 2008). Os efeitos do dano do nervo da córnea induzido pelo BAK são infiltração inflamatória, aumento da expressão de citocinas corticais e conjuntivais, e metaplasia escamosa epitelial da córnea (ALVES, M.; REINACH, P. S.; PAULA, J. S.; VELLASCO E CRUZ, A. A. *et al.*, 2014; BARABINO; CHEN; DANA, 2004; CHEN; FRIZZI; GUERNSEY; LADT *et al.*, 2013; XIONG; CHEN; LIU; LIU *et al.*, 2008)

2.5 Justificativa do estudo

Assim, nosso objetivo neste modelo DOS foi avaliar os desdobramentos do dano causado na superfície ocular, avaliando sensibilidade, sinalização neural, estresse oxidativo e estímulo a produção de citocinas inflamatórias.

Estudamos a fisiopatologia desta condição em modelos animais pela similaridade com os humanos e maior possibilidade de testes moleculares (STERN; PFLUGFELDER, 2017)

Objetivos

3. Objetivos

O objetivo deste estudo foi analisar exames clínicos da superfície ocular, marcadores moleculares da córnea e glândula lacrimal, em modelos animais de olho seco por deprivação hormonal e toxicidade ocular, e compará-los a um grupo controle.

3.1 Objetivos específicos

Analisar a doença do olho seco em diabetes mellitus, hipotireoidismo, e toxicidade ocular por uso contínuo de cloreto de benzalcônio, em modelos animais e para isso:

Obter dados clínicos e histológicos, de córnea, glândulas lacrimais, gânglio do trigêmeo. Coletar a osmolaridade do filme lacrimal e sanguíneo, medir e comparar a espessura do epitélio da córnea, utilizar citocinas pró-inflamatórias e pró-mitóticas em análise quantitativa de PCR em tempo real nos tecidos colhidos, quantificar o estresse oxidativo nas glândulas lacrimais.

Material e métodos

4. Material e métodos

4.1. Modelo do estudo

O estudo foi feito com base em dois modelos distintos de olho seco, sendo o primeiro por deprivação hormonal e o segundo por toxicidade ocular. Em ambos, utilizamos ratos machos, da raça *Wistar*, pesando entre 220-250g, obtidos do biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Todos procedimentos estão de acordo com o uso de animais em pesquisa (ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research) e foram aprovados pelo comitê de ética de experimentação animal local (CETEA-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SP, Protocolo 018/2012, em anexo).

Grupo 1: Diabetes (DM n=10): A indução do DM foi feita através de uma injeção intravenosa na veia caudal dos animais com dose única de 60 mg/kg estreptozotocina (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluída em 0.01 M solução salina. Após a injeção passaram por um jejum de 12 horas. Foram realizados exames de glicemia após 48 horas para verificar a eficácia do procedimento. Este grupo ficou alojado no biotério durante 8 semanas. (DIAS; BATISTA; ROMA; MODULO *et al.*, 2015)

Grupo 2: Hipotireoidismo (HT n=10): Este grupo recebeu Tiamazol (BIOLAB SANUS Farmacêutica Ltda, Taboão da Serra, SP, Brasil) na água do bebedouro na concentração de 500 mg/l continuamente por 5 semanas. A cada dia era avaliada a ingestão de água dos animais a fim de garantir a indução da doença estudada. O grupo CG (n = 10) recebeu água potável. Este grupo ficou alojado no biotério durante 5 semanas.(DIAS, A. C.; MODULO, C. M.; JORGE, A. G.; BRAZ, A. M. *et al.*, 2007)

Grupo 3: Toxicidade por cloreto de benzalcônio (BAK n=10): este modelo foi induzido por instilação de colírio de cloreto de benzalcônio já descrito por outros autores(DAVI LAZARINI MARQUES1, 2015). Duas vezes ao dia, aplicado no olho direito. Sendo o colírio na concentração de 5 µl de cloreto de benzalcônio 0.2% (Fluka analytical, Sigma-Aldrich Brasil Ltda. COTIA, SP, Brasil), durante sete dias.(DAVI LAZARINI MARQUES1, 2015)

Grupo 4: Controles (CG=10): este grupo não recebeu nenhuma intervenção.

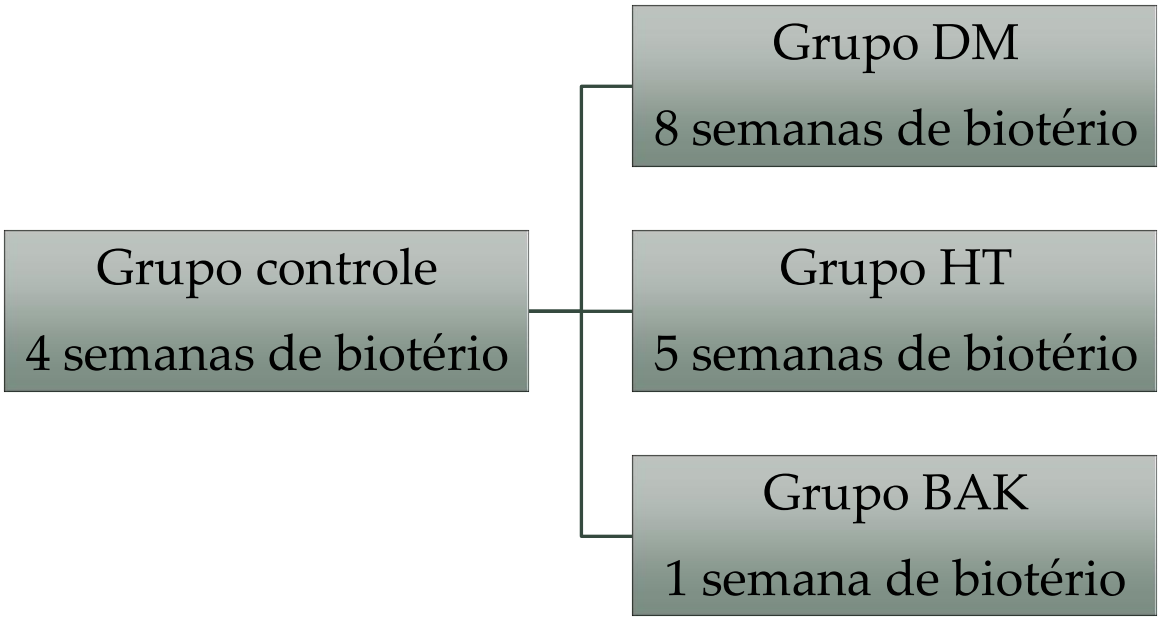

Figura 2. Diagrama do modelo experimental utilizado no estudo. Grupo controle com n=10 animais, sendo o mesmo para todos os grupos, com tempo de permanência no biotério de estudo de 4 semanas. Grupo diabetes (DM) com n=10 animais, com tempo de indução da doença de 8 semanas. Grupo Hipotireoideo (HT), n=10 animais, com tempo de indução da doença de 5 semanas. Grupo cloreto de benzalcônio (BAK), n=10 animais, com tempo de indução da doença de 1 semana.

Todos os ratos foram alojados em caixas apropriadas, em biotério com temperatura constante (23 ± 2ºC) e ciclo de dia e noite de 12 h, com acesso ad libitum a ração padrão de roedores e água potável.

Ao final do período de indução exames para avaliação da glicemia, e níveis hormonais de TSH foram utilizados para validar a indução dos modelos.

Limitações: este estudo não foi aleatorizado nem houve cegamento dos avaliadores em relação aos animais e seus respectivos grupos de doença.

4.2 Avaliação Funcional

Teste Pata Olho

Para avaliar a sensibilidade ocular dos animais, utilizamos um teste com capsaicina (CAP) a 10 μM diluída em PBS at pH 7.2 and 25ºC (Sigma-Aldrich Brazil Ltda., Cotia, SP, Brasil). O teste consistiu em ambientar os animais, em uma sala própria fora do biotério, com temperatura ambiente, em uma caixa plástica transparente por uma hora, um dia antes da eutanásia. Em seguida, imobilizando o animal uma gota da CAP foi instilada através de uma micropipeta, no olho direito de cada um (n=10 animais por grupo) esperando cerca de 5 segundos para que o colírio molhasse toda a superfície ocular. Assim, o animal era colocado de volta dentro da caixa e a gravação dos movimentos de coçar o olho com a pata eram registrados, durante 3 minutos, com câmera digital (DSC-W5, Sony, Japão) somente os movimentos do lado direito foram contabilizados e somente os movimentos pata ao olho. Ao fim da gravação os olhos eram lavados com solução fisiológica para alivio da sensação de ardor. Avaliadores diferentes fizeram a contagem, utilizando mascaramento de grupo, um computador com software de vídeo em câmera lenta foi utilizado (iMac computer, Apple Inc, Cupertino, CA, USA).

No dia da eutanásia, sob anestesia intramuscular de quetamina (5 mg/100 g b.w.) (União Química Farmacêutica S.A, Embu-Guaçu, SP, Brazil) e xilazina (2 mg/100g b.w.) (Laboratorio Callier S.A., Barcelona, Spain)) os animais foram avaliados nos seguintes exames:

Avalição da osmolaridade Lacrimal

Osmolaridade do filme lacrimal foi feita através de pequenas amostras de lágrimas, do olho direito de cada animal, obtidas por um delicado coletor do aparelho (Osmometer Tearlab, San Diego, CA, USA) sem estimulação, sob anestesia, apenas encostando o aparelho borda palpebral obtendo um volume de 50-200 nanolitros de lágrima. A osmolaridade foi medida através do Osmômetro Tearlab osmolarity system logo após cada coleta, usando coletores descartáveis para cada animal.

Osmolaridade sanguínea

A osmolaridade sanguínea foi medida através do ponto de congelamento da solução de plasma sanguíneo colhido após eutanásia, a osmolaridade obtida pelo aparelho (Advanced Instruments-Two Technology way, Norwood, MA, EUA) em volume de 100µl de plasma sanguíneo.

Biomicroscopia

Uma gota do colírio de fluoresceína sódica tópica (1%) foi instilada, e em seguida o animal foi posicionado na lâmpada de fenda e tirada fotos do olho direito de cada animal na luz incandescente e na luz azul de cobalto, a fim de analisar qualitativamente a superfície córneo-conjuntival, avaliando ceratite e neovascularização. Seguindo três classes ausente, leve e moderado.

Teste de fenol vermelho

Foram usados barbantes impregnados com vermelho de fenol (Showa Yakuhin Kako Co; Ltd, Tokyo, Japan & Menicon USA Inc., Clovis, CA, USA) sendo quantificada a quantidade de lágrima em milímetros (mm) no olho direito, através dos barbantes posicionados na borda palpebral inferior por 30 segundos (Barabino 2005).

Eutanásia

A eutanásia dos animais foi feita através de superdosagem sob anestesia intramuscular de quetamina (5 mg/100 g b.w.) (União Química Farmacêutica S.A, Embu-Guaçu, SP, Brazil) e xilazina (2 mg/100g b.w.) (Laboratorio Callier S.A., Barcelona, Spain)) e Tiopental sódico (Laboratório Cristália, São Paulo, SP, Brasil(1000 mg/kg)).

4.3 Histologia

Após a eutanásia a GL e CO foram coletadas, fixadas em formaldeído a 17% por 24 horas, desidratadas em série crescente de etanol, diafanizada em xilol e embebidas 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).

Foram realizadas análises morfométricas e descritivas de todos os grupos estudados com (n=10/grupo). Imagens digitais foram obtidas do centro da córnea, medidas através de software do próprio microscópio, em três seções e posteriormente obtida uma média de cada olho de cada animal dos grupos estudados. Sendo os mesmos em cortes axiais, com 20X magnificação no microscópio ótico (Leica Microsystems, DM 4000 B LED, Wetzlar, Alemanha). E cortes da GL no sentido sagital na magnificação 20x.

4.4. PCR Quantitativo em tempo real (qPCR)

A expressão relativa do mRNA das citocinas pró-inflamatórias *Il1b, Il6, Tnf, Mmp9* foi comparada nas amostras de GL, CO e TG dos grupos DM, HT, BAK e CG. Além disso, a expressão relativa do mRNA dos elementos de reparo tecidual em GL *Bmp7, Runx1, Runx3, Fgf10 e Smad1* foram comparados nesses grupos.

As amostras de tecido colhidas de cada animal, padronizadas pelo lado direito, foram embebidas imediatamente ao serem retiradas dos animais em solução de estabilização de RNA (RNAlater Solution, Ambion, Waltham, MA, EUA) e armazenadas a -80ºC até proceder à extração, quantificação, avaliação da qualidade e análise quantitativa de PCR em tempo real (qPCR).

O qPCR foi realizado usando sondas de hidrólise (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). As amostras totais de RNA foram extraídas dos tecidos, usando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificadas com um espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

Amostras contendo 500ng de RNA total do tecido da CO, 1000ng de RNA total do tecido GL e 150ng do GT foram usadas para sintetizar o cDNA com o QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Germantown, MD, EUA) no sistema ProFlex PCR (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA).

O qPCR foi realizado usando o sistema de PCR em tempo real ViiA7 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). As sondas de hidrólise que foram utilizadas estão listadas na (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação de Sondas usadas no qPCR em tempo real.

Citocinas pró-inflamatórias	**Sondas**
Il1b	Rn.PT 5838028824 (IL-1*β)**
Il6	Rn.PT 5813840513 (IL6)*
Mmp9	Rn.PT 587383134 (MMP9)*
Tnf	Rn.PT 5811142874 (TNF-*α)**
Beta actina (controle endógeno)	Rn.PT 589220704.g (*β-actin)**
Citocinas pró-mitóticas	**Sondas**
Bmp7	Rn.PT 5810180444 (BMP7)*
Fgf10	Rn.PT 5810814634 (FGF10)*
Runx1	Rn00569082_m1 (RUNX1)**
Runx3	Rn00590466_m1 (RUNX3)**
Smad1	Rn00565555_m1 (SMAD1)**

Fornecedores * IDT - Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa,USA; **Applied Biosystems,Carlsbad,CA, USA**.**

Cada reação de amplificação foi realizada em duplicata com 5,5 µL de QuantiNova Probe PCR Kit (Qiagen, Germantown, MD, EUA), 0,5 µL de sonda de hidrólise e 4,5 µL de diluição 1: 4 do cDNA em um volume total de 10 µL. Os ciclos para PCR em tempo real foram os seguintes: um ciclo de 95 ° C por 2 minutos, 50 ciclos de 5 segundos a 95 ° C e 19 segundos a 60 ° C. A quantificação relativa foi determinada pelo Thermo Fisher Cloud Software, RQ versão 3.7 utilizando o delta CT (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

4.5 Enzimas antioxidantes e produtos de estresse oxidativo

Os mecanismos da DOS no DM e no HT estão associados ao estresse oxidativo (Sarandol, Tas et al. 2005, Knas, Maciejczyk et al. 2016). Para investigar seu papel na função prejudicada da GL e, portanto, suas repercussões na UFL, comparamos a atividade de enzimas oxidativas nas GL dos grupos DM, HT, BAK e CG, ao final do tempo de experimentação.

Dissulfeto de glutationa (GSSG) (glutationa oxidada), GSH (glutationa reduzida) e total

As GL dos quatro grupos (n = 10 / grupo) foram homogeneizados em um tampão padrão fornecido pelo produtor do Kit de Ensaio Fluorimétrico de Glutationa (BioVision Incorporated, Milpitas, CA, EUA). Cada amostra foi normalizada para fornecer 40 mg de tecido LG. As reações foram processadas como indicado no protocolo do fabricante e a fluorescência das amostras e controles foi lida no seguinte comprimento de onda de Excitação / Emissão 340/420 nm em um espectrofotômetro (SpectroMax M3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Catalase

Neste também foram utilizadas as GL de DM, HT, BAK e CG (n = 10/grupo) foram homogeneizados e 100 mg de amostra de tecido foram submetidos à análise de acordo com o protocolo do produtor (Catalase Assay Kit, BioVision Incorporated, Milpitas, CA, EUA). A medição colorimétrica foi realizada no comprimento de onda de 570nm em um leitor de placas, utilizando o espectrofotômetro acima mencionado, e as concentrações de H2O2 obtidas em comparação com uma curva padrão fornecida pelo fabricante e entre os grupos.

4.6 Análise estatística

O software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para obter estatística descritiva. E para comparar a resposta dos grupos em relação ao grupo controle, usamos os testes não paramétricos, mono-caudais, Mann-Whitney-U. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

Resultados

5. Resultados

5.1. Avaliação funcional

Utilizamos o teste comportamental com CAP (10 µM), porque sua resposta aguda aos receptores TRPV1 na córnea geram uma sensação de calor e ardência sendo útil na avaliação da sensibilidade ocular. Com isto, apenas o grupo BAK apresentou hiperalgesia quando comparado ao grupo CG (P = 0,0001. Figura 3A).

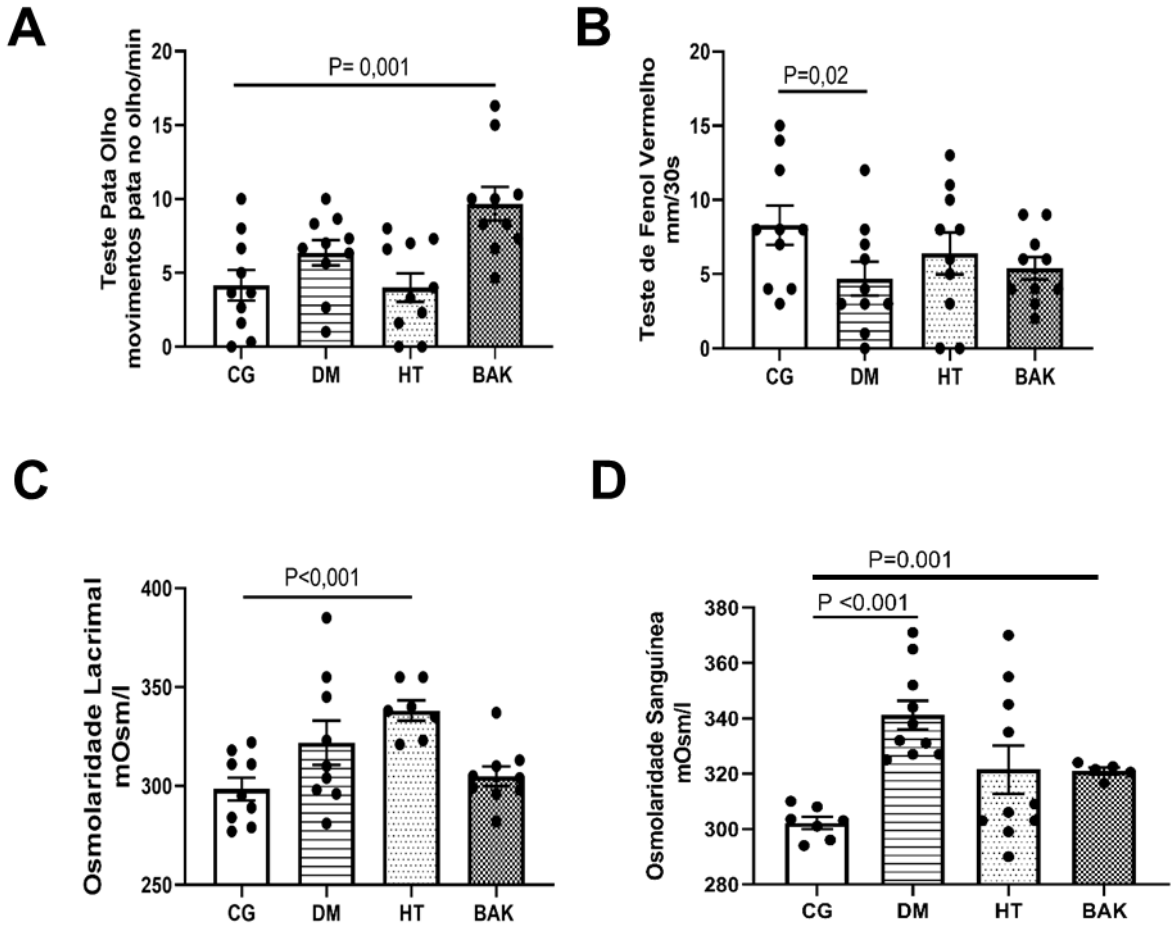

Figura 3. Exames clínicos funcionais. A) O resultado do teste pata olho (dado em movimentos da pata ao olho direito por minuto) após o recebimento de uma gota de capsaicina (CAP) 10 µM. Nesse teste o grupo BAK apresentou maior frequência de movimentos compatíveis com hiperalgesia (P = 0,001). B) Teste de fenol vermelho: dado em milímetros do fio de barbante molhado pelas lágrimas em 30 segundos, onde DM apresentou menor média de fluxo lacrimal (P= 0,02). C) Avaliação da osmolaridade do filme lacrimal, através do aparelho Tear Lab®. O grupo HT apresentou um filme lacrimal hiperosmolar em relação ao CG (P<0,001). D) avaliação da osmolaridade sanguínea feita através do ponto de congelamento do plasma. Os grupos DM e BAK apresentaram hiperosmolaridade sanguínea quando comparados ao CG (P<0,001 e P=0,001 respectivamente). Foram utilizados n=10 ratos por grupo, e a análise estatística aplicou o teste U de Mann-Whitney.

No teste de fenol vermelho, utilizado para avaliar o fluxo lacrimal em cada grupo estudado, o grupo DM apresentou menor fluxo lacrimal quando comparado ao CG (P = 0,02. Figura 3B).

Na avaliação da osmolaridade do filme lacrimal, o grupo HT teve o filme lacrimal hiperosmolar em comparação com o CG (P<0,001. Figura 3C).

Já a avaliação da osmolaridade sanguínea feita através do plasma por ponto de congelamento, os grupos DM e BAK estavam hiperosmolares quando comparados ao CG (P<0,001 e P=0,001 respectivamente. Figura 3D).

O colírio de fluoresceína sódica foi instilado para avaliar a integridade do epitélio junto a observação na lâmpada de fenda, utilizada para identificar a presença de neovasos e ceratites (Figura 4).

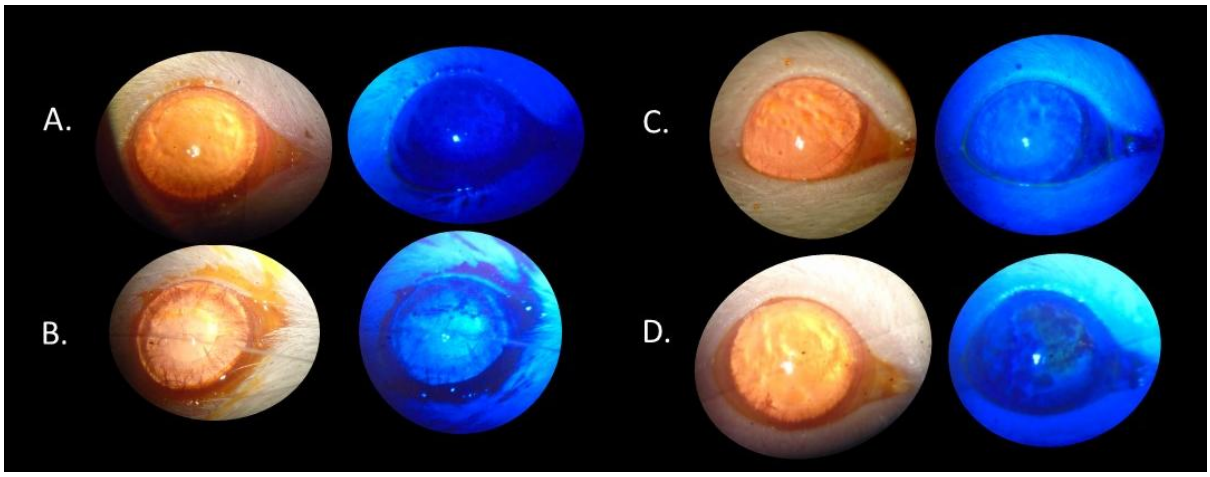

Figura 4. Exame da lâmpada de fenda. Imagens do olho direito dos grupos experimentais obtidos através da lâmpada de fenda no dia da eutanásia. A) Grupo controle (CG); B) Grupo Diabetes Melittus (DM); C) Grupo Hipotireoidismo (HT); D) Grupo cloreto de benzalcônio (BAK). Todas imagens tiradas em lâmpada de fenda com luz incandescente e azul de cobalto, utilizando colírio de fluoresceína sódica.

A partir das imagens dos olhos não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de estudo e o grupo controle.

5.3. Histologia

Foram colhidos para avaliação histológica córnea e glândula lacrimal de todos os grupos. Assim, na córnea foram obtidas as medidas de epitélio e

comparados entre os grupos tratados versus o controle (Figura 5). Encontramos o grupo BAK com diferença significativa em relação ao grupo CG, apresentando diminuição na camada de células epiteliais ao fim do período de indução. As imagens dos cortes histológicos logo a seguir (Figura 6).

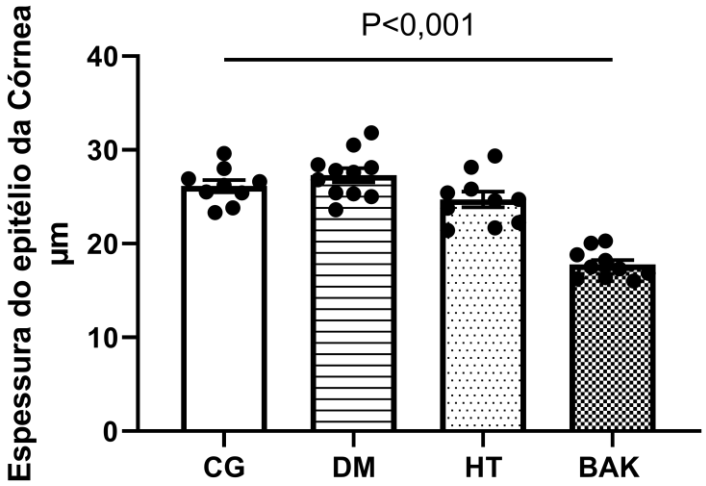

Figura 5. Espessura do epitélio da córnea. Dados obtidos de cortes histológicos da córnea do olho direito de cada grupo. Estas foram medidas em três secções do epitélio somadas e divididas para o cálculo da média de cada olho por animal. O grupo BAK apresentou diferença significativa em relação ao CG (p<0,001). Foram utilizados n=10 ratos por grupo, e a análise estatística aplicou o teste U de Mann-Whitney.

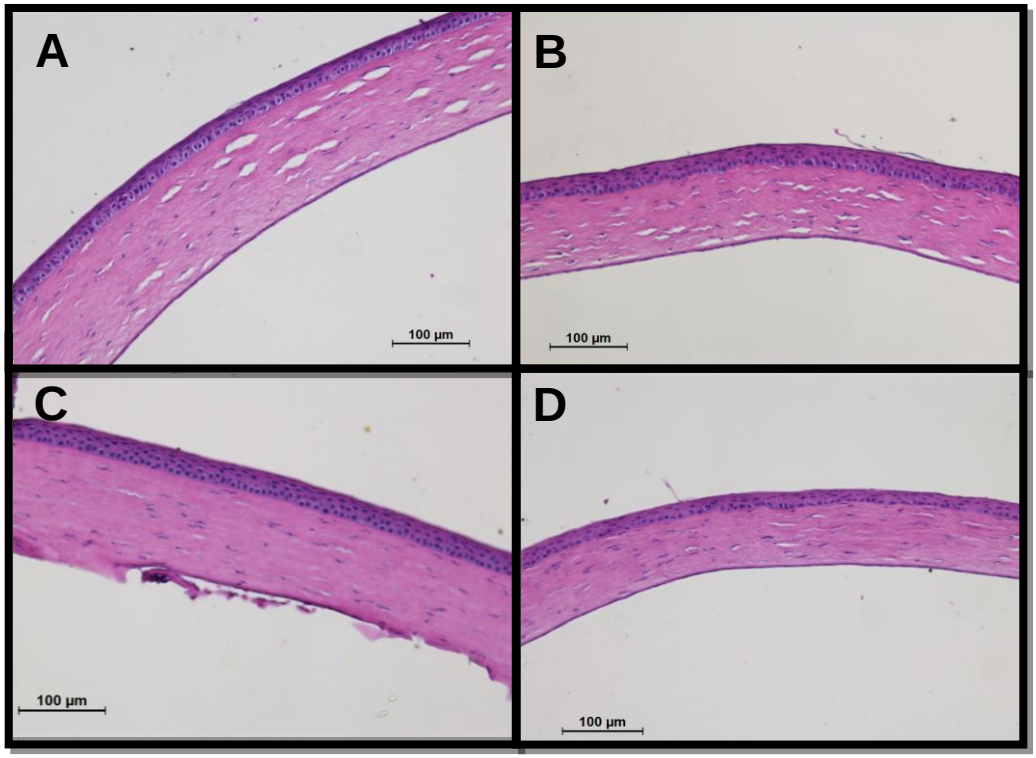

Figura 6. Cortes histológicos da córnea. Imagens do olho direito dos grupos experimentais obtidos através da coloração de H&E no dia da eutanásia. A) Grupo controle (CG); B) Grupo Diabetes Melittus (DM); C) Grupo Hipotireoidismo (HT); D) Grupo cloreto de benzalcônio (BAK). Fotografadas em microscópio eletrônico com magnificência de 20x.

E ainda, as GL foram comparadas buscando inflamação e obstrução de drenagem dos ductos (Figura 7). As imagens colaboram para os achados moleculares, pois, podemos notar a diferença no tamanho e forma dos ácinos, espaço intersticial, despolarização dos núcleos e forma dos ductos entre o grupo BAK (Figura 7-D) e o CG (Figura 7- A), induzindo inflamação na GL devido ao dano na superfície ocular.

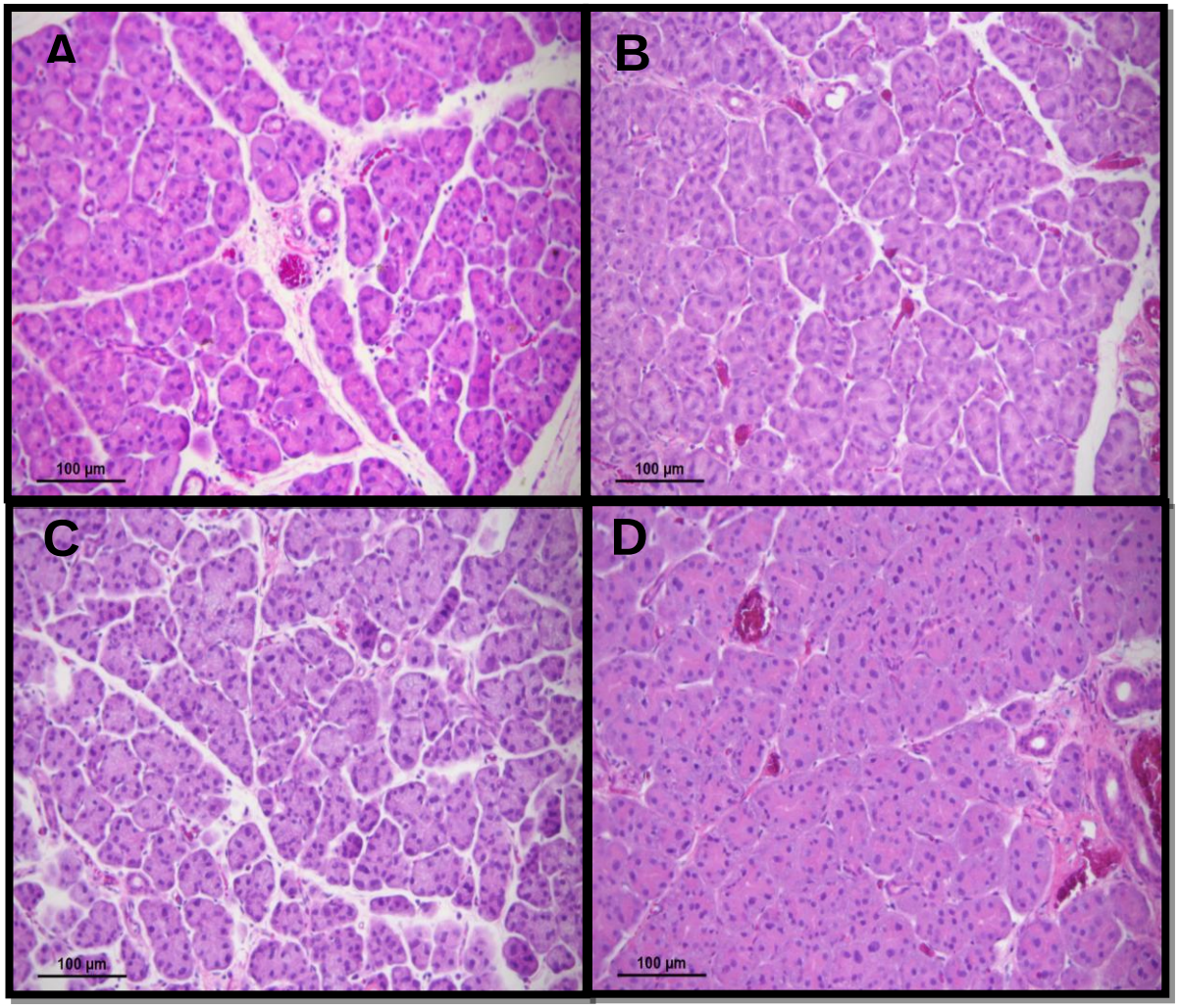

Figura 7. Cortes histológicos da glândula lacrimal. Imagens da glândula lacrimal do lado direito dos grupos experimentais obtidos através da coloração de H&E no dia da eutanásia. A) Grupo controle (CG); B) Grupo Diabetes Melittus (DM); C) Grupo Hipotireoidismo (HT); D) Grupo cloreto de benzalcônio (BAK). Fotografadas em microscópio eletrônico com magnificência de 20x.

5.4 qPCR (PCR quantitativo em tempo real)

Utilizamos três tecidos de interesse na UFL, sendo esses: córnea (CO), glândula lacrimal (GL) e gânglio do trigêmeo (GT). E selecionamos marcadores pró-inflamatórios, marcadores de reparo tecidual e receptor para dor na córnea.

Dentre os grupos, houve uma diminuição de expressão de mRNA dos receptores de *TRPV1* na córnea quando comparados ao CG no grupo DM (P = 0,03) (Figura 8).

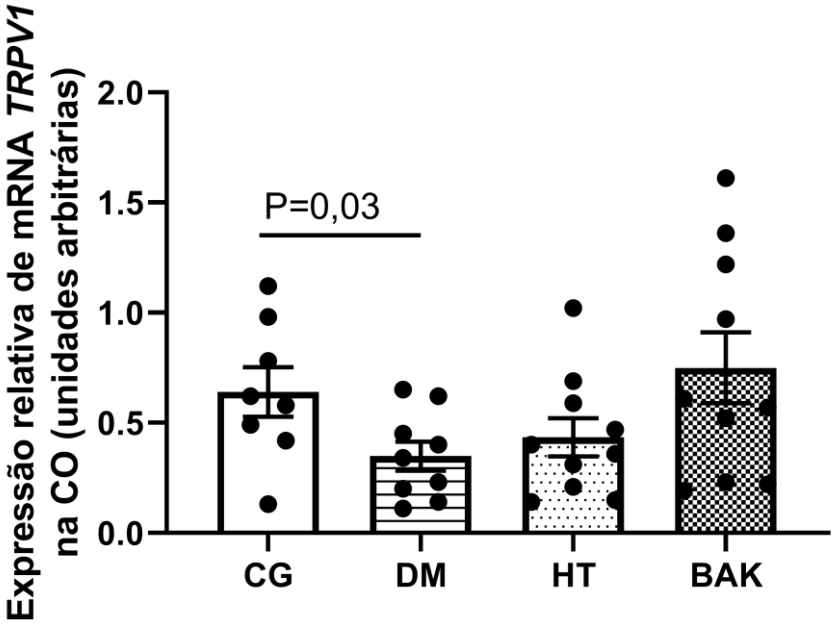

Figura 8. Expressão relativa de mRNA para receptores de *TRPV1* na CO. Obtido em unidades arbitrárias (n=10/animais por grupo). O grupo DM apresentou menor expressão relativa quando comparado ao CG (P=0,03). Análise estatística aplicou o teste U de Mann-Whitney.

As citocinas pró-inflamatórias *Il1b, Il6, Tnf, Mmp9* foram analisadas na CO e estão abaixo na (Figura 9). E como resultado, houve menor expressão relativa de *Mmp9* no grupo HT e relação ao CG (P<0,001). Nas outras analises não obtivemos diferenças estatísticas.

Córnea

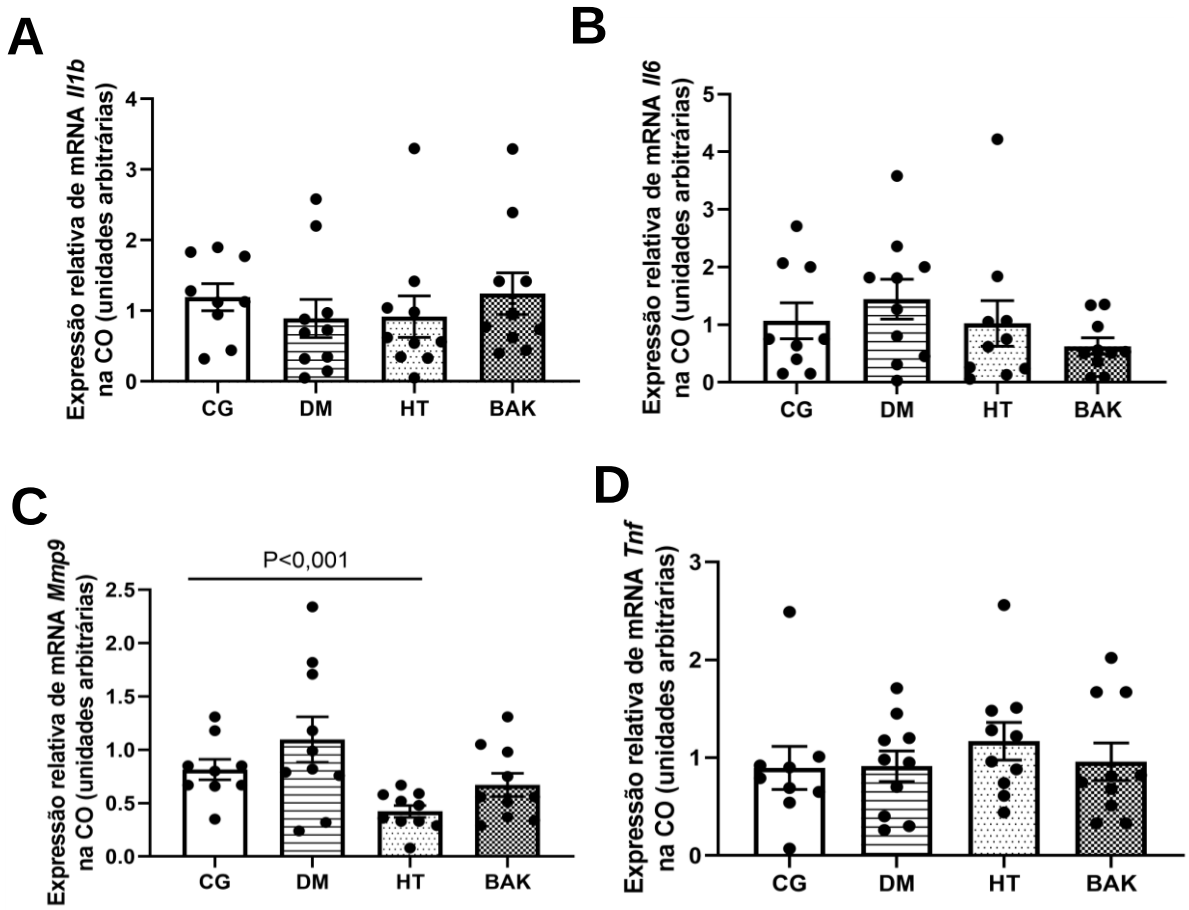

Figura 9. Expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias por qPCR na CO. Análise de *Il1b, Il6, Mmp9 e Tnf* por qPCR na CO (expresso em unidades arbitrárias, normalizadas por mRNA de β-actina). C) O grupo HT apresentou diferença significativa em relação ao CG (P<0,001) na citocina *Mmp9* (n=10/animais por grupo). A análise estatística aplicou o teste U de Mann-Whitney.

Na glândula lacrimal, a expressão de mRNA das citocinas pró-inflamatórias mostrou aumento de *Il1b* no grupo BAK (P<0,001) e no grupo DM (P=0,03). E também, aumento de *Il6* (P=0,03) e menor expressão de *Mmp9* no grupo BAK (P=0,009)(Figura 10).

Glândula lacrimal

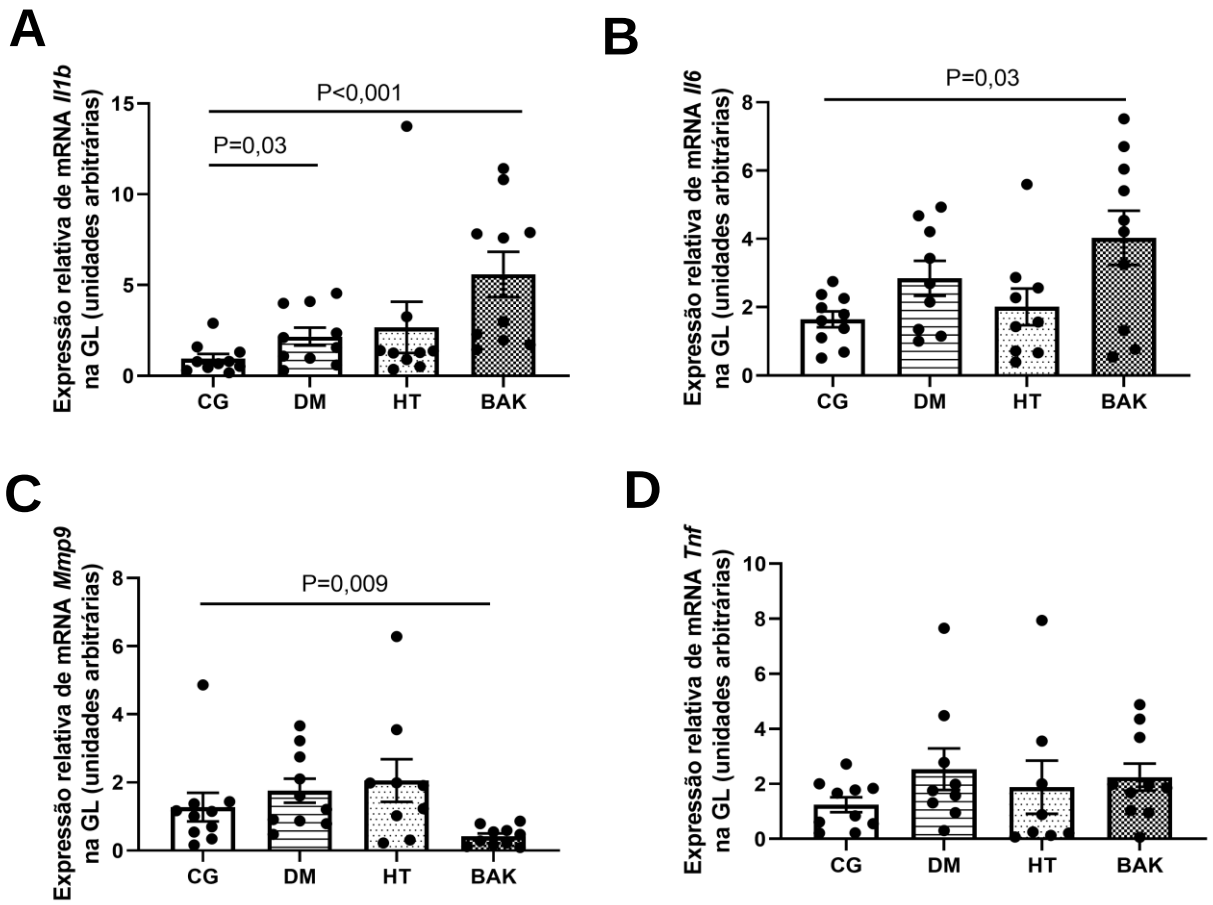

Figura 10. Expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias por qPCR na GL. Analise de *Il1b, Il6, Mmp9 e Tnf* por qPCR na GL (expresso em unidades arbitrárias, normalizadas por mRNA de β-actina). A) O grupo BAK e o DM apresentou maior expressão relativa de RNAm de *Il1b*(P<0,001 e P=0,03 respectivamente). B) Somente o grupo BAK mostrou aumento de Il6 (P=0,03). C) BAK apresentou diminuição de Mmp9 (P=0,009). A análise estatística aplicou o teste U de Mann-Whitney.

Já na expressão relativa de mRNA dos mediadores de reparo tecidual ou pró mitóticos, obtivemos os seguintes resultados: o grupo DM diminui a expressão relativa de *Runx1* (P = 0,02), entretanto o *Runx3* aumentou no grupo HT (P = 0,01) e diminui no grupo BAK (P = 0,009). (Figura 11)

Glândula lacrimal – citocinas pró mitóticas

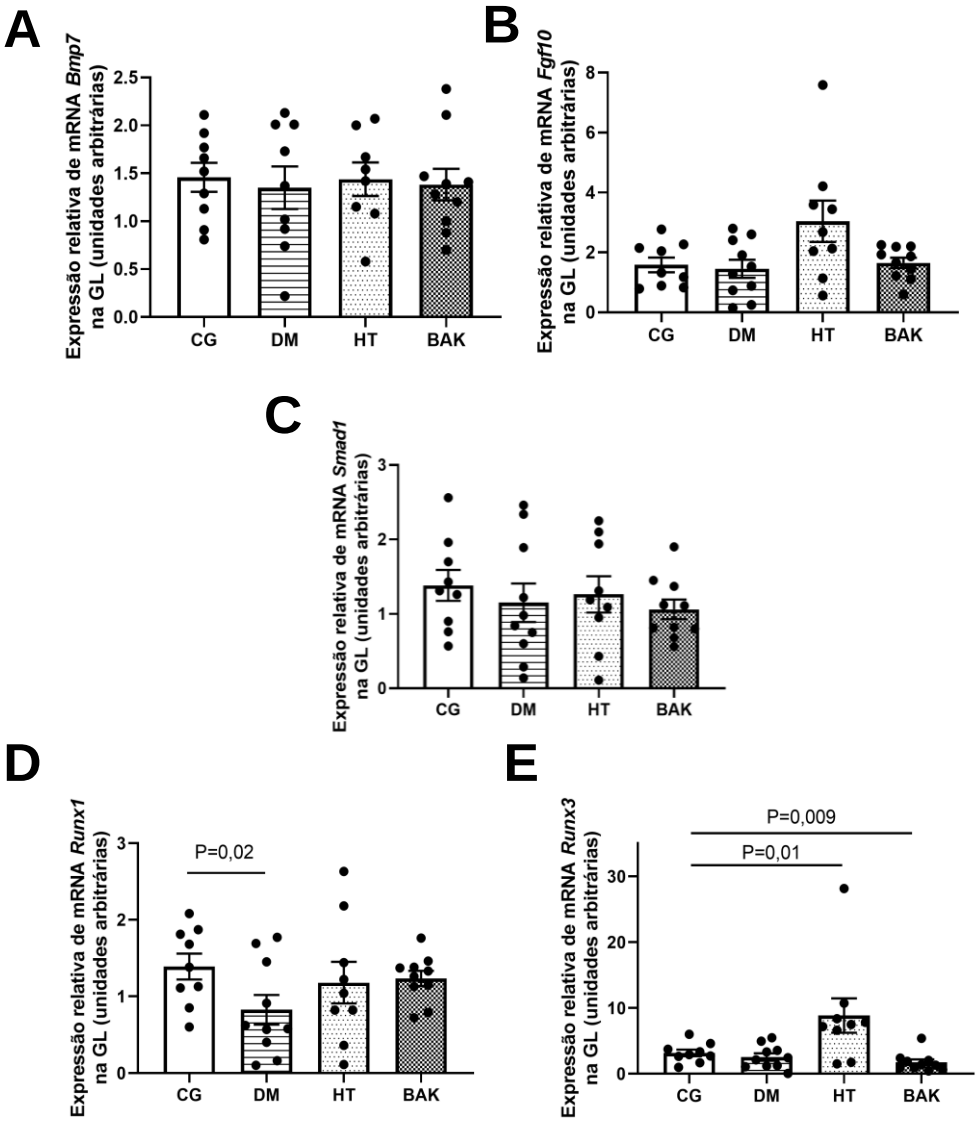

Figura 11.

Expressão relativa de mRNA de citocinas pró-mitóticas na GL. Análise de *Bmp7, Fgf10, Smad1, Runx1* e *Runx3* por qPCR na GL (expresso em unidades arbitrárias, normalizadas por mRNA de β-actina). D)O grupo DM mostrou diminuição da expressão relativa de *Runx1* (P=0,02).E) O grupo HT aumento da expressão relativa de *Runx3* (P=0,01) já o BAK diminuição desta citocina (P=0,009). A análise estatística aplicou o teste U de Mann-Whitney.

Por fim, no gânglio do trigêmeo a expressão relativa das citocinas pró-inflamatórias mostrou nos grupos HT e BAK aumentou da expressão relativa de *Il1b* (P = 0,004 e P = 0,01 respectivamente); e o grupo DM aumento da *Il6* (P= 0,02). E ainda no grupo BAK maior expressão de *Tnf* (P = 0,04) (Figura 12).

Gânglio do trigêmio

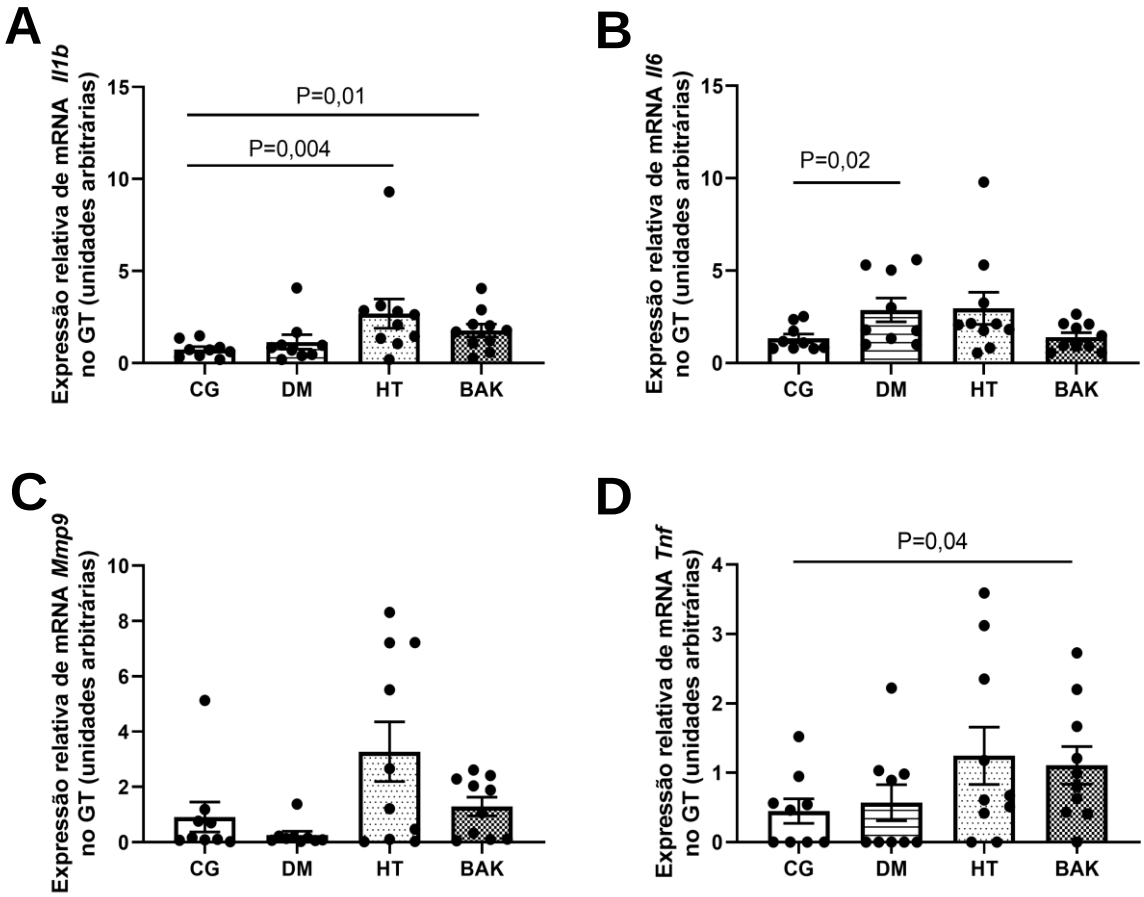

Figura 12. Expressão relativa de mRNA de citocinas pró-inflamatórias de *Il1b, Il6, Mmp9 e Tnf* por qPCR na GT (expresso em unidades arbitrárias, normalizadas por mRNA de β-actina). O grupo BAK e o HT apresentou maior expressão relativa de RNAm de *Il1b*(P=0,01 e P=0,004 respectivamente). E ainda, o grupo DM mostrou aumento de *Il6* (P=0,02), e o grupo BAK aumento de *Tnf* (P=0,04).(n=10 animais por grupo), a análise estatística aplicou o teste U de Mann-Whitney.

5.5 Dosagem de enzimas e produtos de estresse oxidativo

Realizamos testes enzimáticos para determinar o estresse oxidativo da GL dos grupos versus o CG. Na análise da enzima catalase observamos que os grupos DM e HT apresentaram diferença significativa em comparação ao CG (P<0,001 e P=0,02 respectivamente), indicando maior atividade enzimática na glândula, o que contribui para inflamação e desequilíbrio homeostático (KNAS; MACIEJCZYK; DANISZEWSKA; KLIMIUK *et al.*, 2016).

Já no teste GSSG, medimos a atividade da glutationa para encontrar algum padrão correspondente ao quadro clínico de DOS. No entanto, não obtivemos diferença estatística (Figura 13).

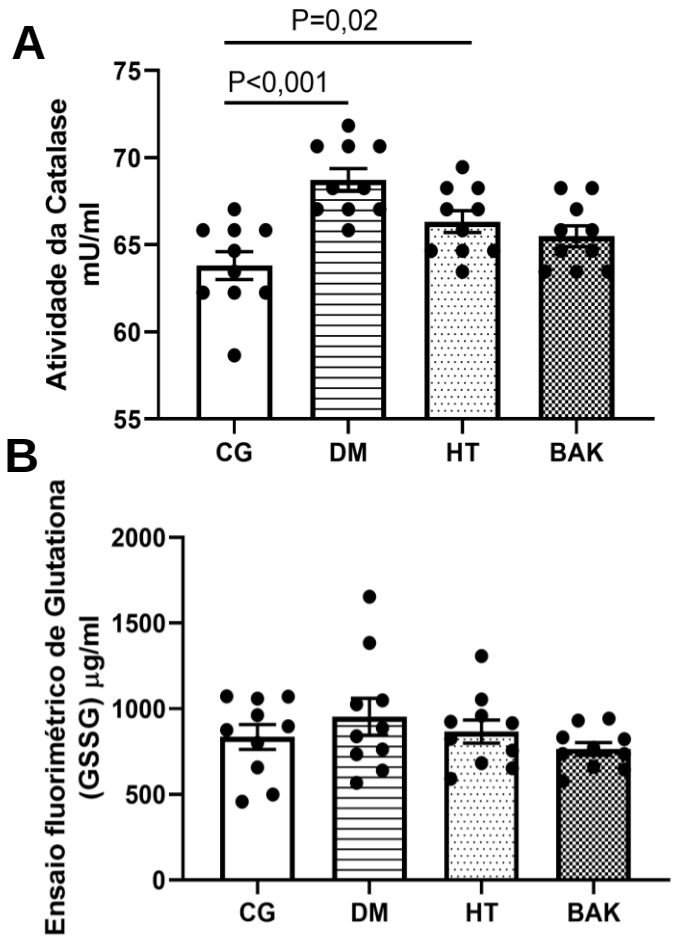

Figura 13. Avaliação do estresse oxidativo na GL. A) Atividade da Catalase na GL medido em mU/ml, o grupo DM apresentou resultado significativo (P<0,001) demonstrando maior atividade da catalase em relação ao CG, e o grupo HT apresentou diferença significativo em relação ao CG (P=0,02). B) Ensaio fluorimétrico de Glutationa (GSSG), mensurado pelo espectrofotômetro e convertido para µg/ml. Não houve diferença significativa entre os grupos de estudo. (n=10/animais por grupo).

Por fim, resumimos os dados obtidos nos testes funcionais e moleculares na tabela a seguir (Tabela 2), a fim de sintetizar e mostrar como cada grupo se comportou em relação ao grupo controle.

Tabela 2 - Resumo com os resultados obtidos nos grupos estudados.

Grupo	DM			HT			BAK		
Teste Pata olho								↑	
Fenol vermelho		↓							
Osm Lacrimal					↑				
Osm sanguínea		↑						↑	
Catalase		↑			↑				
Espessura da CO								↓	
qPCR/ Tecido	CO	GT	GL	CO	GT	GL	CO	GT	GL
Il1b			↑		↑			↑	↑
Il6		↑							↑
Mmp9				↓					↓
Tnf								↑	
TRPV1	↓								
qPCR/ Tecido		GL			GL			GL	
Runx1		↓							
Runx3					↑			↓	

Legenda: ↑- aumento em relação ao grupo controle; ↓- diminuição em relação ao grupo controle; DM- grupo diabético, HT- grupo hipotireoideo, BAK- cloreto de benzalcônio, CO- córnea, GT- gânglio do trigêmeo, GL- glândula lacrimal, Osm- osmolaridade, *Il1b*- interleucina 1 beta, *Il6*- interleucina 6, *Mmp9*- metaloproteinases 9, Tnf- fator de necrose tumoral alfa, TRPV1- receptor vanilóide 1, Runx1- fator de transcrição 1 relacionado ao runt, Runx3- fator de transcrição 3 relacionado ao runt, Smad1- membro da família SMAD.

Discussão

Este trabalho confirma os modelos animais da DOS causados por deficiência hormonal, sendo DM induzida por estreptozotocina e HT induzido por metimazol (ADEGHATE; PONERY; HAMEED, 2005; DIAS; BATISTA; ROMA; MODULO *et al.*, 2015; DIAS, ANA CAROLINA; MODULO, CAROLINA MARIA; JORGE, ANGELICA GOBBI; BRAZ, ALEXANDRE MARTINS *et al.*, 2007; MODULO; JORGE; DIAS; BRAZ *et al.*, 2009), e ainda, o modelo de toxicidade ocular proposto pelo grupo BAK sendo estes bons modelos de estudo da DOS, pois em todos eles obtivemos diferentes manifestações envolvendo a UFL.

O modelo DM, apresentou hiperestesia na superfície ocular em muitos ratos mas não de maneira estatisticamente significante, quando comparados aos controles devido a variabilidade dentro do grupo DM. O padrão de baixo fluxo lacrimal, alta osmolaridade sanguínea, e a tendência a maior osmolaridade do filme lacrimal são igualmente descritos em relatos de DOS e DM (CHEN; FRIZZI; GUERNSEY; LADT *et al.*, 2013; COUSEN; CACKETT; BENNETT; SWA *et al.*, 2007; LEPPIN; BEHRENDT; REICHARD; STACHS *et al.*, 2014; LV; LI; ZHANG; XU *et al.*, 2014). Estes dados indicam a dificuldade de caracterizar a DOS com apenas um teste, diante da variabilidade intra grupo, pois mesmo em grupos experimentais de estudos onde conseguimos homogeneizar a herança genética, o tempo de doença e as condições ambientais aparecem as especificidade individuais (ALVES, MONICA; REINACH, PETER SOL; PAULA, JAYTER SILVA; VELLASCO E CRUZ, ANTONIO AUGUSTO *et al.*, 2014; BARABINO; CHEN; DANA, 2004; BARABINO; DANA, 2004; GARCIA; REIS DE OLIVEIRA; MODULO; FAUSTINO *et al.*, 2018; LV; LI; ZHANG; XU *et al.*, 2014; MODULO; JORGE; DIAS; BRAZ *et al.*, 2009).

Outro ponto interessante, foi que a sensibilidade em resposta a CAP observada no teste pata olho nos ratos do grupo DM, não estava associada a quantidade de receptores *TRPV1* sensíveis a CAP na córnea, pois este grupo apresentou baixa expressão relativa em relação ao CG. No entanto, estavam em concordância com a maior quantidade de mRNa de citocinas pró inflamatórias como *Il6,* no gânglio do trigêmeo do grupo DM. Estas observações podem sugerir o tipo de mecanismo de dor neuropática em DM, que se estenderia ao gânglio do trigêmeo e sistema nervoso central como descrito em trabalhos prévios de neuropatia corneal (DAVIDSON; COPPEY; KARDON; YOREK, 2014; DAVIDSON;

COPPEY; YOREK, 2012; NIELSEN; LUND, 1979; RAMOS-REMUS; SUAREZ-ALMAZOR; RUSSELL, 1994).

O dano oxidativo da GL observado no grupo DM, visto através dos altos níveis de atividade da Catalase na GL, corrobora com ensaios clínicos e estudos experimentais onde o alto nível de stress oxidativo se dá em glândulas exócrinas (ATLI; KEVEN; AVCI; KUTLAY *et al.*, 2004; DECONTE; OLIVEIRA; CALABRIA; OLIVEIRA *et al.*, 2011; JORGE; MODULO; DIAS; BRAZ *et al.*, 2009; KNAS; MACIEJCZYK; DANISZEWSKA; KLIMIUK *et al.*, 2016). Assim, o dano oxidativo pode fazer parte no comprometimento da função, e, portanto, são necessários mais estudos que abordem este aspecto como estratégia terapêutica para o olho seco em DM.

Analisando agora o grupo HT, este apresentou hipoestesia e alta osmolaridade do filme lacrimal ao final das 5 semanas de indução da doença. O fluxo lacrimal apresentou uma grande variabilidade no grupo, confirmado pelo baixo valor preditivo do teste de fenol vermelho (BARABINO; CHEN; DANA, 2004). As manifestações funcionais de DOS no HT e DM mostraram diferentes tendências, confirmando o largo espectro de manifestações da DOS associada a diferentes doenças em humanos (ALVES, M.; REINACH, P. S.; PAULA, J. S.; VELLASCO E CRUZ, A. A. *et al.*, 2014; GARCIA; REIS DE OLIVEIRA; MODULO; FAUSTINO *et al.*, 2018).

Em relação a expressão relativa de mRNA, as citocinas pró inflamatórias mostraram uma baixa expressão de *Mmp9* na córnea de maneira significativa, no entanto as outras citocinas não, quando comparadas ao grupo CG. Este resultado foi diferente de estudos recentes in vitro, onde em um curto período de hiperosmolaridade ocorreram a indução de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo um mecanismo compensatório através do curso da doença (IGARASHI; FUJIMOTO; SUZUKI; ONO *et al.*, 2014). Contudo, o alto nível de citocinas pró-inflamatórias de mRNA *Il1b* no gânglio do trigêmeo indica o impacto do HT em toda UFL. Além disso, a hipoestesia da córnea seria uma consequência da deprivação hormonal dos hormônios tireoidianos, talvez explicado pela diminuição da condução dos nervos periféricos, como observados recentemente em humanos (GUPTA; ARORA; SHARMA; ARORA, 2016).Já que, os níveis de

receptores de *TRPV1* não estavam estatisticamente diferentes dos animais do grupo CG. Mais estudos são necessários para clarear os detalhes desta associação.

Na GL, o grupo apresentou maior expressão de *Il1b, assim* como observado no grupo DM. E o estresse oxidativo, como parte do mecanismo da DOS na GL foi confirmado em ambos os grupos pelo alto nível da atividade da catalase comparado com o grupo CG (DIAS, A. C.; MODULO, C. M.; JORGE, A. G.; BRAZ, A. M. *et al.*, 2007; SARANDOL; TAS; DIRICAN; SERDAR, 2005).

Em HT, a expressão relativa de mRNA de marcadores de regeneração tecidual ou pró-mitóticos testados na GL como Runx3 foi significativamente maior que no grupo CG. No entanto no grupo DM o mRNA de Runx1 foi baixo e no BAK Runx3 significativamente menor que o grupo CG. Isto pode indicar uma tentativa de recuperação da glândula lacrimal a nível tecidual e atividade metabólica, na qual está prejudicada como descrito aqui e em estudos prévios (DIAS, A. C.; MODULO, C. M.; JORGE, A. G.; BRAZ, A. M. *et al.*, 2007; VORONOV; GROMOVA; LIU; ZOUKHRI *et al.*, 2013; ZOUKHRI, 2010; ZOUKHRI; FIX; ALROY; KUBLIN, 2008).

Já o modelo BAK, apresentou hiperestesia ao teste pata olho com CAP sendo significativamente diferente do CG, uma tendência a menor fluxo lacrimal pelo teste de fenol vermelho, acreditamos que por dificuldades de sensibilidade no método e fatores externos como anestesia e umidade local não obtivemos a diferença com valores significativos estatisticamente (BARABINO; ANTONELLI; CIMBOLINI; MAURO *et al.*, 2014; VITOUX; KESSAL; MELIK PARSADANIANTZ; CLARET *et al.*, 2020). O grupo BAK apresentou diminuição na espessura do epitélio da córnea de maneira significativa em relação ao grupo CG (BARABINO; ANTONELLI; CIMBOLINI; MAURO *et al.*, 2014; BAUDOUIN; LABBE; LIANG; PAULY *et al.*, 2010).

A expressão relativa de mRNA do receptor de *TRPV1* na CO não foi diferente do grupo CG, o que colabora com a tese de que o mecanismo de dor trigeminal persiste durante a inflamação (BARABINO; ANTONELLI; CIMBOLINI; MAURO *et al.*, 2014; BELMONTE; NICHOLS; COX; BROCK *et al.*, 2017).

As citocinas pró inflamatórias na GL apresentaram expressão relativa maior que o grupo CG em *Il6, Il1b* e menor em *Mmp9*, mostrando que além da CO as GL

também são afetadas durante o processo de DOS (BARABINO; CHEN; DANA, 2004). Além disso, a histologia da GL mostrou que este grupo apresentou uma fase aguda de inflamação, hiperplasia, despolarização dos núcleos em relação ao CG, corroborando com os achados bioquímicos do qPCR (FOULKS, 2011; VITOUX; KESSAL; MELIK PARSADANIANTZ; CLARET *et al.*, 2020)

E ainda, a expressão relativa de mRNA de *Il1b* e *Tnf* no GT estão maiores no grupo BAK em relação ao grupo CG, confirmando o que estudos prévios diziam sobre uso crônico de BAK e queimadura alcalina induzirem inflamação no GT (YANG; ZHANG; LIU; WANG *et al.*, 2017).

Em resumo, o presente estudo identificou a extensão dos efeitos da deprivação hormonal e toxicidade ocular para a unidade funcional lacrimal e observamos vários aspectos destas doenças, desde a parte funcional a mecanismos moleculares, e em como se distinguem em ambas as doenças DM, HT e BAK. Esta não foi a nossa primeira tentativa de compará-las, em termos de gravidade das manifestações, é por isso que todas as comparações foram feitas com análises pareadas com o grupo controle e ambas as condições analisadas em diferentes tempos finais, onde cada doença claramente manifestava a DOS (a.e. 5 semanas para HT, e 8 semanas para DM, e uma semana para BAK). Embora possa ser inferido algum paralelo o desenho do estudo se limita a comparações diretas.

Conclusão

Em conclusão, nosso estudo mostrou que DM, HT e BAK, induzem inflamação, danos neurosensoriais levando a mudanças distintas na unidade funcional lacrimal compatíveis com DOS. Que não se limitam a córnea e glândula lacrimal. Isso confirma as dificuldades apresentadas em estudos clínicos que tentam caracterizar as mudanças induzidas por distúrbios hormonais crônicos, onde mesmo com outras influências neutralizadas no modelo experimental, como disparidade genética, tempo de doença, e influências ambientais na história natural da doença ocorrem variações nas manifestações entre e dentro dos grupos dos modelos.

Nos DM levaram a perda de sensibilidade e inflamação na SO e GT. No grupo HT, inflamação na SO e GT e aumento nos mediadores de reparação tecidual da GL. E o BAK, hiperestesia na SO e inflamação na GL e GT. Nenhum marcador molecular apresentou uma resposta uniforme nas diferentes condições de olho seco

Em todas as doenças notamos repercussão no sistema nervoso central através da resposta inflamatória no GT.

Nós esperamos que estas observações possam contribuir em estudos futuros, e em possíveis diagnósticos e tratamentos para DOS.

Referências

ACHTSIDIS, V.; ELEFTHERIADOU, I.; KOZANIDOU, E.; VOUMVOURAKIS, K. I. *et al.* Dry eye syndrome in subjects with diabetes and association with neuropathy. **Diabetes Care**, 37, n. 10, p. e210-211, Oct 2014.

ADEGHATE, E.; PONERY, A.; HAMEED, R. Notes on the effect of diabetes mellitus on the morphology and function of the rat lacrimal gland. **The Ocular Surface**, 3, p. S42, 2005.

ALANAZI, S. A.; ALOMRAN, A. A.; ABUSHARHA, A.; FAGEHI, R. *et al.* An assessment of the ocular tear film in patients with thyroid disorders. **Clin Ophthalmol**, 13, p. 1019-1026, 2019.

ALVES, M.; REINACH, P. S.; PAULA, J. S.; VELLASCO E CRUZ, A. A. *et al.* Comparison of diagnostic tests in distinct well-defined conditions related to dry eye disease. **PLoS One**, 9, n. 5, p. e97921, 2014. Research Support, Non-U.S. Gov't.

ALVES, M.; REINACH, P. S.; PAULA, J. S.; VELLASCO E CRUZ, A. A. *et al.* Comparison of Diagnostic Tests in Distinct Well-Defined Conditions Related to Dry Eye Disease. **Plos One**, 9, n. 5, MAY 21 2014 2014.

ATLI, T.; KEVEN, K.; AVCI, A.; KUTLAY, S. *et al.* Oxidative stress and antioxidant status in elderly diabetes mellitus and glucose intolerance patients. **Arch Gerontol Geriatr**, 39, n. 3, p. 269-275, 2004 Nov-Dec 2004.

BARABINO, S.; ANTONELLI, S.; CIMBOLINI, N.; MAURO, V. *et al.* The effect of preservatives and antiglaucoma treatments on the ocular surface of mice with dry eye. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 55, n. 10, p. 6499-6504, Sep 9 2014.

BARABINO, S.; CHEN, W.; DANA, M. R. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations. **Exp Eye Res**, 79, n. 5, p. 613-621, Nov 2004.

BARABINO, S.; DANA, M. R. Animal models of dry eye: a critical assessment of opportunities and limitations. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 45, n. 6, p. 1641-1646, Jun 2004.

BAUDOUIN, C.; LABBE, A.; LIANG, H.; PAULY, A. *et al.* Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. **Prog Retin Eye Res**, 29, n. 4, p. 312-334, Jul 2010.

BELMONTE, C.; NICHOLS, J. J.; COX, S. M.; BROCK, J. A. *et al.* TFOS DEWS II pain and sensation report. **The Ocular Surface**, 15, n. 3, p. 404-437, 2017.

BENSENOR, I. M. Thyroid disorders in Brazil: the contribution of the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). **Braz J Med Biol Res**, 52, n. 2, p. e8417, Feb 14 2019.

BRON, A. J.; DE PAIVA, C. S.; CHAUHAN, S. K.; BONINI, S. *et al.* TFOS DEWS II pathophysiology report. **Ocul Surf**, 15, n. 3, p. 438-510, Jul 2017.

BRON, A. J.; TOMLINSON, A.; FOULKS, G. N.; PEPOSE, J. S. *et al.* Rethinking dry eye disease: a perspective on clinical implications. **Ocul Surf**, 12, n. 2 Suppl, p. S1-31, Apr 2014.

BURMAN, K. D. Thyroid disorders and diseases. **Med Clin North Am**, 96, n. 2, p. xiii-xiv, Mar 2012.

CASTRO, J. S.; SELEGATTO, I. B.; CASTRO, R. S.; MIRANDA, E. C. M. *et al.* Prevalence and Risk Factors of self-reported dry eye in Brazil using a short symptom questionnaire. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 2076, Feb 1 2018.

CHAKER, L.; BIANCO, A. C.; JONKLAAS, J.; PEETERS, R. P. Hypothyroidism. **The Lancet**, 390, n. 10101, p. 1550-1562, 2017.

CHEN, D. K.; FRIZZI, K. E.; GUERNSEY, L. S.; LADT, K. *et al.* Repeated monitoring of corneal nerves by confocal microscopy as an index of peripheral neuropathy in type-1 diabetic rodents and the effects of topical insulin. **J Peripher Nerv Syst**, 18, n. 4, p. 306-315, Dec 2013.

CLAYTON, J. A. Dry Eye. **N Engl J Med**, 378, n. 23, p. 2212-2223, Jun 7 2018.

COUSEN, P.; CACKETT, P.; BENNETT, H.; SWA, K. *et al.* Tear production and corneal sensitivity in diabetes. **J Diabetes Complications**, 21, n. 6, p. 371-373, Nov-Dec 2007.

DAVI LAZARINI MARQUES1, M. A. E. M. R., Carolina Maria Modulo3 Osmolaridade lacrimal e superfície ocular em modelo de olho seco por toxicidade. **Rev Bras Oftalmol. 2015; 74 (2): 68 - 72**, 74, n. 2, p. 68-72, 2015.

DAVIDSON, E. P.; COPPEY, L. J.; KARDON, R. H.; YOREK, M. A. Differences and similarities in development of corneal nerve damage and peripheral neuropathy and in diet-induced obesity and type 2 diabetic rats. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, 55, n. 3, p. 1222-1230, Mar 2014. Comparative Study

Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.

DAVIDSON, E. P.; COPPEY, L. J.; YOREK, M. A. Early loss of innervation of cornea epithelium in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats: improvement with ilepatril treatment. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 53, n. 13, p. 8067-8074, Dec 2012.

DECONTE, S. R.; OLIVEIRA, R. J.; CALABRIA, L. K.; OLIVEIRA, V. N. *et al.* Alterations of antioxidant biomarkers and type I collagen deposition in the parotid gland of streptozotocin-induced diabetic rats. **Arch Oral Biol**, 56, n. 8, p. 744-751, Aug 2011.

DIAS, A.; MODULO, C.; JORGE, A.; BRAZ, A. *et al.* Influence of thyroid hormone on thyroid hormone receptor beta-1 expression and lacrimal gland and ocular surface morphology. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 0146-0404, 48, n. 7, p. 3038-3042, JUL 2007 2007.

DIAS, A. C.; BATISTA, T. M.; ROMA, L. P.; MODULO, C. M. *et al.* Insulin replacement restores the vesicular secretory apparatus in the diabetic rat lacrimal gland. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 78, n. 3, p. 158-163, May-Jun 2015. Research Support, Non-U.S. Gov't.

DIAS, A. C.; MODULO, C. M.; JORGE, A. G.; BRAZ, A. M. *et al.* Influence of thyroid hormone on thyroid hormone receptor beta-1 expression and lacrimal gland and ocular surface morphology. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 48, n. 7, p. 3038-3042, JUL 2007 2007.

DIAS, A. C.; MODULO, C. M.; JORGE, A. G.; BRAZ, A. M. *et al.* Influence of thyroid hormone on thyroid hormone receptor beta-1 expression and lacrimal gland and ocular surface morphology. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 48, n. 7, p. 3038-3042, Jul 2007.

FOULKS, G. N. BAK to Basics. **The Ocular Surface**, 9, n. 3, 2011.

FUERST, N.; LANGELIER, N.; MASSARO-GIORDANO, M.; PISTILLI, M. *et al.* Tear osmolarity and dry eye symptoms in diabetics. **Clin Ophthalmol**, 8, p. 507-515, 2014.

GALOR, A.; MOEIN, H. R.; LEE, C.; RODRIGUEZ, A. *et al.* Neuropathic pain and dry eye. **Ocul Surf**, 16, n. 1, p. 31-44, Jan 2018.

GARCIA, D. M.; REIS DE OLIVEIRA, F.; MODULO, C. M.; FAUSTINO, J. *et al.* Is Sjogren's syndrome dry eye similar to dry eye caused by other etiologies? Discriminating different diseases by dry eye tests. **PLoS One**, 13, n. 12, p. e0208420, 2018.

GUPTA, N.; ARORA, M.; SHARMA, R.; ARORA, K. S. Peripheral and Central Nervous System Involvement in Recently Diagnosed Cases of Hypothyroidism: An Electrophysiological Study. **Ann Med Health Sci Res**, 6, n. 5, p. 261-266, Sep-Oct 2016.

IGARASHI, T.; FUJIMOTO, C.; SUZUKI, H.; ONO, M. *et al.* Short-time exposure of hyperosmolarity triggers interleukin-6 expression in corneal epithelial cells. **Cornea**, 33, n. 12, p. 1342-1347, Dec 2014.

ISKELELI, G.; KARAKOC, Y.; ABDULA, A. Tear film osmolarity in patients with thyroid ophthalmopathy. **Jpn J Ophthalmol**, 52, n. 4, p. 323-326, Jul-Aug 2008.

JORGE, A. G.; MODULO, C. M.; DIAS, A. C.; BRAZ, A. M. *et al.* Aspirin prevents diabetic oxidative changes in rat lacrimal gland structure and function. **Endocrine**, 35, n. 2, p. 189-197, Apr 2009.

KLOOSTERBOER, A.; DERMER, H. I.; GALOR, A. Diagnostic tests in dry eye. **Expert Review of Ophthalmology**, 14, n. 4-5, p. 237-246, 2019.

KNAS, M.; MACIEJCZYK, M.; DANISZEWSKA, I.; KLIMIUK, A. *et al.* Oxidative Damage to the Salivary Glands of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes-Temporal Study: Oxidative Stress and Diabetic Salivary Glands. **J Diabetes Res**, 2016, p. 4583742, 2016.

LEPPIN, K.; BEHRENDT, A. K.; REICHARD, M.; STACHS, O. *et al.* Diabetes mellitus leads to accumulation of dendritic cells and nerve fiber damage of the subbasal nerve plexus in the cornea. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 55, n. 6, p. 3603-3615, Jun 2014.

LV, H.; LI, A.; ZHANG, X.; XU, M. *et al.* Meta-analysis and review on the changes of tear function and corneal sensitivity in diabetic patients. **Acta Ophthalmol**, 92, n. 2, p. e96-e104, Mar 2014. Meta-Analysis

Research Support, Non-U.S. Gov't

Review.

MESSMER, E. M. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. **Dtsch Arztebl Int**, 112, n. 5, p. 71-81; quiz 82, Jan 30 2015.

MODULO, C. M.; JORGE, A. G.; DIAS, A. C.; BRAZ, A. M. *et al.* Influence of insulin treatment on the lacrimal gland and ocular surface of diabetic rats. **Endocrine**, 36, n. 1, p. 161-168, Aug 2009.

NIELSEN, N. V.; LUND, F. S. Diabetic polyneuropathy. Corneal sensitivity, vibratory perception and Achilles tendon reflex in diabetics. **Acta Neurologica Scandinavica**, 59, n. 1, p. 15-22, Jan 1979.

NOECKER, R.; MILLER, K. V. Benzalkonium Chloride in Glaucoma Medications. **The Ocular Surface**, 9, n. 3, p. 159-162, 2011.

NORLINA RAMLI, G. S., Amir Samsudin, Azida Juana, Mimiwati Zahari, and May May Choo. Ocular Surface Disease in Glaucoma: Effect of Polypharmacy and Preservatives. **Optometry and Vision Science**, Vol. 92, No. 9, September 2015, 2015.

PARK, J.; KIM, J.; LEE, H.; PARK, M. *et al.* Functional and structural evaluation of the meibomian gland using a LipiView interferometer in thyroid eye disease. **Can J Ophthalmol**, 53, n. 4, p. 373-379, Aug 2018.

RAMOS-REMUS, C.; SUAREZ-ALMAZOR, M.; RUSSELL, A. S. Low tear production in patients with diabetes mellitus is not due to Sjogren's syndrome. **Clin Exp Rheumatol**, 12, n. 4, p. 375-380, Jul-Aug 1994.

SARANDOL, E.; TAS, S.; DIRICAN, M.; SERDAR, Z. Oxidative stress and serum paraoxonase activity in experimental hypothyroidism: effect of vitamin E supplementation. **Cell Biochem Funct**, 23, n. 1, p. 1-8, Jan-Feb 2005.

STAPLETON, F.; ALVES, M.; BUNYA, V. Y.; JALBERT, I. *et al.* TFOS DEWS II Epidemiology Report. **Ocul Surf**, 15, n. 3, p. 334-365, Jul 2017.

STERN, M. E.; GAO, J.; SIEMASKO, K. F.; BEUERMAN, R. W. *et al.* The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. **Exp Eye Res**, 78, n. 3, p. 409-416, Mar 2004.

STERN, M. E.; PFLUGFELDER, S. C. What We Have Learned From Animal Models of Dry Eye. **Int Ophthalmol Clin**, 57, n. 2, p. 109-118, Spring 2017.

STEVEN, D. W.; ALAGHBAND, P.; LIM, K. S. Preservatives in glaucoma medication. **Br J Ophthalmol**, 102, n. 11, p. 1497-1503, Nov 2018.

UCHINO, M.; SCHAUMBERG, D. A.; DOGRU, M.; UCHINO, Y. *et al.* Prevalence of dry eye disease among Japanese visual display terminal users. **Ophthalmology**, 115, n. 11, p. 1982-1988, Nov 2008.

VITOUX, M. A.; KESSAL, K.; MELIK PARSADANIANTZ, S.; CLARET, M. *et al.* Benzalkonium chloride-induced direct and indirect toxicity on corneal epithelial and trigeminal neuronal cells: proinflammatory and apoptotic responses in vitro. **Toxicol Lett**, 319, p. 74-84, Feb 1 2020.

VORONOV, D.; GROMOVA, A.; LIU, D.; ZOUKHRI, D. *et al.* Transcription factors runx1 to 3 are expressed in the lacrimal gland epithelium and are involved in regulation of gland morphogenesis and regeneration. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 54, n. 5, p. 3115-3125, 2013.

WILLCOX, M. D. P.; ARGUESO, P.; GEORGIEV, G. A.; HOLOPAINEN, J. M. *et al.* TFOS DEWS II Tear Film Report. **Ocul Surf**, 15, n. 3, p. 366-403, Jul 2017.

XIONG, C.; CHEN, D.; LIU, J.; LIU, B. *et al.* A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 49, n. 5, p. 1850-1856, May 2008.

YANG, Q.; ZHANG, Y.; LIU, X.; WANG, N. *et al.* A Comparison of the Effects of Benzalkonium Chloride on Ocular Surfaces between C57BL/6 and BALB/c Mice. **Int J Mol Sci**, 18, n. 3, Feb 26 2017.

ZHANG, X.; ZHAO, L.; DENG, S.; SUN, X. *et al.* Dry Eye Syndrome in Patients with Diabetes Mellitus: Prevalence, Etiology, and Clinical Characteristics. **J Ophthalmol**, 2016, p. 8201053, 2016.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, 414, n. 6865, p. 782-787, Dec 13 2001.

ZOUKHRI, D. Mechanisms involved in injury and repair of the murine lacrimal gland: role of programmed cell death and mesenchymal stem cells. **Ocul Surf**, 8, n. 2, p. 60-69, Apr 2010.

ZOUKHRI, D.; FIX, A.; ALROY, J.; KUBLIN, C. L. Mechanisms of murine lacrimal gland repair after experimentally induced inflammation. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 49, n. 10, p. 4399-4406, Oct 2008.

Anexos da Tese

Aprovação do comitê de ética em experimentação animal: Protocolo 018/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal
(16) 3602-3301

FMRP - USP
Faculdade de Medicina

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação **nº 018/2012**, sobre o projeto intitulado *"Avaliação da osmolaridade do filme lacrimal e da superfície ocular em modelos animais de olho seco"*, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Eduardo Melani Rocha** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 26 de março de 2012.

(We certify that the protocol ***nº 018/2012***, about ***"Evaluation of tear film osmolarity and ocular surface in animal models of dry eye"***, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in ***03/26/2012***.

Ribeirão Preto, 26 de março de 2012.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Tabela com os dados colhidos:

Teste de fenol vermelho	DM	HT	BAK	CT
	0	0	2	8
	12	0	6	4
	3	5	3	8
	6	11	4	4
	3	13	4	7
	4	6	4	15
	8	3	9	3
	3	8	9	14
	7	8	7	12
	1	10	6	8

Teste Pata Olho	DM	HT	BAK	CT
	6,33	7	6,66	2,66
	8,33	7,3	4,66	3,66
	7,33	8	10	0
	8,66	4	16,3	0,33
	10	1,6	10,3	3,66
	6,66	6,6	8,3	5
	1	0	15	10
	5,66	2,3	10	1,6
	7	3,3	7,3	8
	2,66	0	8,3	6,66

osm lacrimal	DM	HT	BAK	CT
	385	338	310	322
	281	355	298	311
	355	355	304	311
	345	340	296	318
	323	335	305	277
	310	321	299	279
	298	323	337	284
	304		282	295
	296		313	289

osm sanguinea	DM	HT	BAK	CT
	332	306	320,5	294
	327	309	322,5	296
	325	299	321,5	303,5
	331	303	324	303
	327	303	316,5	301
	365	290		308
	344	335		310
	371	345		
	352	355		
	338	370		

Catalase	DM	HT	BAK	CT
	67,05	64,65	68,25	64,65
	67,05	64,65	63,45	62,25
	71,85	67,05	65,85	65,85

PCR CO MMP9	CT	DM	HT	BAK
	0,8	0,24	0,36	0,51
	0,66	1,18	0,52	1,31
	0,85	0,82	0,29	0,98
	0,67	1,82	0,33	1,05
	0,35	0,99	0,58	0,37
	1,18	0,79	0,33	0,29
	1,31	0,32	0,08	0,34
	0,85	0,76	0,67	0,56
	0,67	1,71	0,48	0,75
		2,34	0,59	0,56

CO IL1b	CT	DM	HT	BAK
	0,95	0,05	0,98	0,62
	1,12	0,88	3,3	3,29
	0,44	0,32	0,35	2,39
	1,13	0,69	0,56	0,95
	0,32	0,97	1,42	0,44
	1,77	2,2	0,62	0,74
	1,28	0,35	0,05	0,4
	1,83	0,15	0,54	1,42
	1,9	0,73	0,33	1,42
		2,58	1,04	0,77

CO IL6	CT	DM	HT	BAK
	2	0,03	1,07	0,09
	0,15	0,8	4,22	0,97
	0,75	0,45	0,13	1,35
	2,71	1,82	0,62	0,36
	0,15	3,58	1,84	0,08
	0,64	1,27	1,05	0,53
	2,07	0,31	0,06	0,5
	0,75	2,36	0,75	0,56
	0,4	2	0,24	1,34
		1,81	0,26	0,51

CO TNFA	CT	DM	HT	BAK
	0,65	0,4	0,44	0,33
	0,54	0,98	2,56	2,02
	0,69	1,18	1,22	0,82
	0,92	0,7	0,88	0,68
	0,07	0,95	1,51	1,67
	1,01	1,45	1,48	0,75
	0,9	1,2	0,74	0,33
	0,79	0,3	0,61	0,51
	2,49	0,26	0,96	1,67
		1,71	1,28	0,81

CO TRPV1	CT	DM	HT	BAK
	0,62	0,2	0,31	0,61
	0,42	0,62	1,02	0,52
	1,12	0,34	0,47	0,23

70,65	65,85	68,25	58,66	0,58	0,4	0,4	0,19
70,65	63,45	65,85	65,85		0,45	0,21	0,22
67,05	68,25	64,65	63,45	0,78	0,23	0,69	1,61
68,25	64,65	63,45	65,85	0,49	0,11	0,14	1,36
70,65	68,25	63,45	62,25	0,13	0,14	0,36	1,22
65,85	67,05	64,65	62,25	0,98	0,65	0,15	0,57
68,25	69,45	67,05	67,05			0,59	0,97

GSSG	DM	BAK	HT	CT
	1653,48	831,99	756,13	800,67
	1025,39	661,3	590,43	457,17
	638,71	644,78	915,13	897,66
	1048,38	736,42	823,84	1070,81
	887,62	577,73	1307,87	1071,83
	763,13	735,68	923,77	875,91
	567,11	772,85	652,36	962,21
	733,79	942,13	958,78	658,23
	838,85	821,86	682,86	499,06
	1383,47	930,04	1054,6	1059,81

GT MMP9	CT	DM	HT	BAK
	0,07	0,09	0,02	0,11
	0,02	0,03	7,22	2,41
	1,19	1,38	0,03	2,04
	0,7	0,16	8,31	2,61
	0,76	0,15	0,1	0,33
	0,09	0,07	1,21	1,89
	5,13	0,06	0,47	2,29
	0,16	0,22	2,66	0,05
	0,1	0,14	5,51	1,05
			7,21	0,1

PCR GL MMP9	CT	DM	HT	BAK
	4,86	0,48	3,55	0,79
	1,17	3,66	1,99	0,48
	1,38	0,87	1,91	0,55
	1,15	2,1	0,31	0,86
	0,34	1,6	6,28	0,22
	1,01	2,75	1,02	0,28
	0,54	0,91	1,98	0,12
	0,16	0,79	0,22	0,59
	0,7	1,21	1,23	0,09
	1,44	3,22		0,17

GT IL1b	CT	DM	HT	BAK
	0,19	0,97	1,05	1,09
	0,41	0,19	9,3	1,78
	0,33	4,08	0,19	2,03
	0,86	0,84	2,81	1,69
	0,62	0,71	1,46	2,9
	0,72	0,41	1,34	2,11
	1,48	0,47	2,08	1,21
	0,73	1,67	2,63	4,06
	1,35	0,98	3,12	0,58
			2,85	0,27

GL IL1B	CT	DM	HT	BAK
	1,59	0,29	1,28	2,28
	0,67	2,35	13,74	11,42
	0,79	1,56	0,5	2,98
	0,45	2,1	0,36	10,81
	0,29	1,08	3,25	1,71
	1,31	0,97	1,26	7,89
	0,52	0,6	1,37	1,45
	0,17	4,55	1,39	1,96
	0,78	3,99	0,89	7,59
	2,89	4,1		7,82

GT IL6	CT	DM	HT	BAK
	0,78	1,76	1,82	0,56
	1,09	1,33	9,79	2,1
	2,35	5,03	2,12	1,89
	0,8	5,6	2,07	2,64
	1,17	1,79	5,31	2,13
	1,73	1,01	0,54	0,94
	0,79	1,01	1,75	0,56
	2,52	5,31	0,82	0,91

GL IL6	CT	DM	HT	BAK
	1,6	4,93	2,28	4,54
	1,98	4,68	5,6	7,52
	2,37	2,69	2,56	6,7
	0,51	1,35	0,39	6,04
	0,68	1	0,72	0,54
	2,26	3,43	1,43	5,41
	1,38	1,15	1,56	1,32
	1,79	2,15	0,66	0,76

0,84	3	3,25	1,48
		2,15	0,91

GT TNFA	CT	DM	HT	BAK
	0,56	0,98	1,18	0,41
	1,52	0	3,12	0,99
	0	0	0,61	1,21
	0	0	0,67	2,2
	0,46	2,22	0	2,73
	0	0	0	1,67
	0,95	1,03	0,42	0,63
	0	0	2,35	0,8
	0,54	0,89	0,51	0
			3,59	0,43

GL RUN X3	CT	DM	HT	BAK
	4,6	1,06	1,51	5,37
	2,9	3,31	28,14	0,95
	2,64	4,93	7,81	1,37
	0,99	5,47	1,73	2,03
	1,69	2,43	10,73	2,37
	5,98	1,25	7,49	0,41
		0,05	7,16	1,89
	3,35	1,19	6,62	1,29
	2,7	2,1	8,37	0,64
	3,73	3,55		0,93

GL SMAD	CT	DM	HT	BAK
	0,76	0,29	0,43	1,9
	0,9	1,89	2,25	0,8
	2,56	2,34	1,19	1,45
	1,26	2,46	0,11	1,37
	0,57	1,22	1,31	1,12
	1,7	0,14	1,09	0,81
		0,75	1,94	1,11
	1,96	0,6	2,1	0,82
	1,43	0,98	0,95	0,56
	1,31	0,84		0,68

1,1	4,21	2,87	4,21
2,75			3,25

GL TNFA	CT	DM	HT	BAK
	0,21	1,99	0,07	0,95
	0,22	1,31	7,94	3,69
	1,66	7,65	0,25	1,97
	1,84	0,3	0,89	4,35
	1,78	1,58	0,21	0,06
	0,61	0,95		1,03
	2	4,48	0,13	4,88
	2,72	2,78	2	1,68
	0,55	1,75	3,55	1,99
	0,84			1,85

GL BMP7	CT	DM	HT	BAK
	0,91	1,37	0,58	2,38
	1,29	2,01	2	1,2
	1,92	1,73	1,08	1,47
	1,13	2,13	1,42	2,11
	0,81	0,22	1,54	1,39
	1,77	1,02	1,67	1,28
		0,74	2,07	1,41
	2,11	2,01	1,15	1
	1,66	0,92		0,7
	1,52			0,88

GL FGF10	CT	DM	HT	BAK
	0,83	0,15	1,14	2,19
	1,18	1,53	7,59	1,93
	2,77	2,6	2,68	2,2
	0,89	2,41	0,56	2,25
	0,79	2,8	4,21	1,45
	2,27	0,25	3,44	1,66
		0,88	2,13	1,87
	2,15	0,74	3,59	1,22
	1,32	1,91	2,04	0,6
	2,04	1,28		1,11

RUN X1	CT	DM	HT	BAK
	0,85	0,16	0,36	1,33
	1,11	1,77	2,18	1,13
	2,08	1,45	1,22	1,76
	1,13	1,69	0,11	1,37
	0,6	0,91	1,04	1,26
	1,68	0,1	0,82	1,46
		0,58	1,44	1,15
	1,81	0,4	2,63	1,38
	1,38	0,57	0,82	0,72
	1,87	0,62		0,79