



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

AMANDA LEMOS BARROS MARTINS PORTELA

O PAPEL DA NICERGOLINA NA CICATRIZAÇÃO DE CÓRNEA
EM RATOS DIABÉTICOS

RECIFE
2020

AMANDA LEMOS BARROS MARTINS PORTELA

**O PAPEL DA NICERGOLINA NA CICATRIZAÇÃO DE CÓRNEA
EM RATOS DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Área de concentração: Cirurgia Clínica e Experimental

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira

RECIFE
2020

Catálogo na fonte:
Elaine Freitas- CRB4:1790

P843p	Portela, Amanda Lemos Barros Martins O papel da nicergolina na cicatrização de córnea em ratos diabéticos / Amanda Lemos Barros Martins Portela . – 2022. 37 p. ; il. Orientador: Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Médicas. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2022. Inclui referências, apêndices e anexo. 1. Cicatrização. 2. Diabetes mellitus. 3. Epitélio Corneano. 4. Nicergolina. 5. Neuropatias diabéticas. 6. Complicações do Diabetes. I. Lira, Rodrigo Pessoa Cavalcanti (orientador). II. Título. 617.91 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2022 -274)
-------	---

AMANDA LEMOS BARROS MARTINS PORTELA

**O PAPEL DA NICERGOLINA NA CICATRIZAÇÃO DE CÓRNEA EM RATOS
DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia.
Área de concentração: Cirurgia Clínica e Experimental.

Aprovada em: 16 de setembro de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Esdras Lins (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Profa. Dra. Mônica Alves (Examinador Externo)
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Profa. Dra. Maria Isabel Lynch (Suplente Interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. José Luiz Figueiredo (Suplente Interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dedico essa pesquisa à minha
família **pelo apoio incondicional em**
todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Biotério do Laboratório de Immunopatologia Keizo-Asami (LIKA), ao Núcleo de Cirurgia Experimental (NCE) e ao Laboratório de Biotecnologia e Glicoprotéinas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio, pelos ensinamentos e pela cooperação na execução da pesquisa com animais.

“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.”(CURIE, 1977,p. iii)¹

RESUMO

PORTELA, Amanda Lemos Barros Martins. **O papel da Nicergolina na cicatrização de córnea em ratos diabéticos**. 2020. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, 2020.

A ceratopatia diabética (CD) é uma complicação que acomete as córneas de indivíduos portadores de diabetes mellitus. Cerca de 70% dos diabéticos sofrem de CD. Algumas drogas possuem a capacidade de estimular a liberação de fatores de crescimento que são essenciais para o processo de cicatrização de feridas. Nesse contexto surge a Nicergolina (NCG) que apresenta amplo mecanismo de ação e propriedades antioxidantes. O presente estudo teve como objetivo investigar se a NCG é capaz de aumentar a taxa de reepitelização de úlceras de córnea (UC) de ratos diabéticos portadores de CD. Foram utilizados quarenta e oito ratos diabéticos randomicamente divididos em 02 grupos: **Grupo Nicergolina** – animais tratados com NCG (10mg/kg/dia); **Grupo Controle** – placebo via oral através do método de gavagem, por 15 dias. Assim, uma ferida epitelial da córnea de cerca de 06mm² de área foi criada nos animais, usando um anel de polimento corneano imediatamente, após o término da intervenção. A comparação da área da ferida corneana entre os grupos foi realizada por meio de fotografias seriadas em distintos intervalos de tempo (0 /12 /24 /48 / 72h), utilizando-se um software de análise de imagens. A probabilidade de reepitelização completa da córnea dentro de 72h foi acessada utilizando-se o teste *Kaplan-Meier* de análise de sobrevivência *log-rank*. Análise multivariada foi realizada por meio de regressão de Cox. As análises foram conduzidas usando o SPSS, versão 21 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Valores de P foram bi-caudais e a significância estatística foi estabelecida em 0.05. Dos 24 animais em cada grupo, 12/24 (50%) do Grupo NCG, e 4/24 (17%) no Grupo Controle mostraram reepitelização completa da córnea dentro de 72h (log-rank = 0.027). A análise da regressão de Cox não mostrou nenhuma influência das covariáveis glicemia (P = 0.601), peso (P = 0.322) e duração do diabetes (P = 0.208) na curva de sobrevivência da variável reepitelização corneana. Diante dos resultados a nicergolina é um provável promotor da cicatrização de úlceras de córnea secundárias a ceratopatia diabética.

Palavras-chave: cicatrização; diabetes mellitus; epitélio da córnea; nicergolina; neuropatia diabética; diabetes, complicações.

ABSTRACT

PORTELA, Amanda Lemos Barros Martins. **The role of Nicergoline in corneal healing in diabetic rats.** 2020. Dissertation (Master in Surgery) – Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, 2020.

Diabetic keratopathy (DK) is a complication that affects the corneas of individuals with diabetes mellitus. About 70% of diabetics suffer from DK. Some drugs have the ability to stimulate the release of growth factors that are essential for the wound healing process. In this context, Nicergoline (NCG) appears, which has a broad mechanism of action and antioxidant properties. The present study aimed to investigate whether NCG is able to increase the rate of reepithelialization of corneal ulcers (CU) in diabetic rats with DK. Forty-eight diabetic rats were randomly divided into 02 groups: **Nicergoline Group** – animals treated with NCG (10mg/kg/day); **Control Group** – placebo orally through the gavage method for 15 days. Thus, a corneal epithelial wound of about 06mm² in area was created in the animals using a corneal polishing ring immediately after the end of the intervention. Comparison of the corneal wound area between the groups was performed using serial photographs at different time intervals (0 /12 /24 /48 / 72h), using image analysis software. The probability of complete corneal reepithelialization within 72 h was assessed using the Kaplan-Meier test of log-rank survival analysis. Multivariate analysis was performed using Cox regression. Analyses were conducted using SPSS, version 21 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). P values were two-tailed and statistical significance was set at 0.05. Of the 24 animals in each group, 12/24 (50%) in the NCG Group, and 4/24 (17%) in the Control Group showed complete corneal reepithelialization within 72h (log-rank = 0.027). Cox regression analysis showed no influence of the covariates glycemia (P = 0.601), weight (P = 0.322) and duration of diabetes (P = 0.208) on the survival curve of the corneal reepithelialization variable. In view of the results, nicergoline is a likely promoter of the healing of corneal ulcers secondary to diabetic keratopathy.

Keywords: wound healing; diabetes mellitus; diabetic keratopathy; nicergoline, diabetic neuropathy; corneal epithelium; diabetic complications.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Ritmo de reepitelização corneana em ratosdiabéticos	29
Figura 2 –Representação da coloração com fluoresceína do defeito corneano em ambos os grupos ao longo de 72horas.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados demográficos dos animais diabéticos..... 27

Tabela 2 –Progresso da reepitelização corneana em ratosdiabéticos.....28

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

NCG – Nicergolina

CD – Ceratopatia Diabética

DM – Diabetes Mellitus

PI3K-Akt – Fosfatidilinositol 3 Kinase – Akt

EGF – Fator de crescimento epidérmico

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico

FGF – Fator de crescimento dos fibroblastos

SP – Substância P

NGF- Fator de crescimento dos nervos

IGF-1 – Fator de crescimento derivado da insulina do tipo 1

UN – Úlcera neurotrófica

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami

STZ – Streptozocina

HCL – Ácido clorídrico

OE – Olho esquerdo

UC – Úlcera de córnea

ECR – Ensaio clínico randomizado

PDGF – Fator de crescimento derivado das plaquetas

TGF – Fator de crescimento transformador

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

IL – Interleucina

NK-1 – receptor neurokinina 1

PEDF – Fator derivado do epitélio pigmentar

DHA – ácido docosaheptaenóico

BDNF – Fator neurotrófico derivado cerebral

GNDF – Fator neurotrófico derivado de células da glia

RD – Ratos diabéticos

kDa – Quilodalton

IIQ – Intervalo Interquartil

μm – micrômetros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
4	MÉTODOS	23
4.1	DECLARAÇÃO ÉTICA.....	23
4.2	MODELO EXPERIMENTAL	23
4.3	INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS	23
4.4	EXPOSIÇÃO	24
4.5	CIRURGIA	25
4.6	ANÁLISE DA REEPITELIZAÇÃO DA CÓRNEA	25
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5	RESULTADOS	27
6	DISCUSSÃO	30
7	CONCLUSÃO.....	32
	REFERÊNCIAS.....	33
	ANEXO - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	37

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes acomete 451 milhões de pessoas no mundo e cerca de 70% dessas sofrem de complicações na córnea conhecidas coletivamente como ceratopatia diabética (CD), cujos sinais clínicos são ceratites punctatas, erosões epiteliais recorrentes e úlceras que são refratárias aos tratamentos convencionais, muitas vezes permanecendo abertas e sem cicatrização completa.¹

Estudos prévios controlados com culturas de células epiteliais corneanas em meio com elevados níveis de glicose revelaram que a hiperglicemia, por um período de 48h, é capaz de lentificar a reepitelização corneana para níveis de apenas 29% do normal e elevar sobremaneira a produção de espécies reativas de oxigênio.²

A fisiopatogênese da CD é multifatorial e estudos sugerem que ocorre um prejuízo na sinalização da via de transdução do fosfatidil-inositol-3-kinase (PI3K)-Akt que responde por migração e proliferação celular em vários sistemas, atuando também na cicatrização corneana. Além disso, o estresse oxidativo e a produção de citocinas inflamatórias geradas pela hiperglicemia também contribuem excessivamente na indução de injúria celular.^{2,3}

Outro fator importante é a neuropatia corneal induzida pelo diabetes. Ratos diabéticos induzidos por estreptozocina apresentaram, após 08 semanas da indução, redução importante na densidade dos nervos do plexo basal subepitelial, bem como atraso no fechamento de úlceras epiteliais da córnea comparados ao controle.⁴

Durante a cicatrização de feridas corneanas alguns fatores de crescimento são fundamentais, tais como o *epidermal growth fator* (EGF), *fibroblast growth fator* (FGF), Substância P (SP), nerve growth fator (NGF), *insulin growth fator-1* (IGF-1) dentre outros.^{5,6} Novas drogas estão sendo investigadas para tratar a CD, considerando essa temática, pois o diabetes causa uma diminuição nos níveis de vários fatores de crescimento fundamentais para regeneração epitelial corneana.^{7,8,9,10,11,12}

Algumas drogas são capazes de induzir a liberação de fatores de crescimento, sendo um exemplo deles a Nicergolina. A Nicergolina (10a-methoxy-1,6-dimethylergoline-8β-methanol-5-bromonicotinate, Sermion® , Biogenesis AntiAging, Fish Hoek, África do Sul) (NCG) é um derivado ergolínico indicado para demências cerebrovasculares e possui mecanismo de ação amplo. Atua como

antagonista α -1 adrenérgico, inibidor da acetilcolinesterase, agonista dopaminérgico, indutor do aumento dos níveis de SP e NGF, age como ativador da via do PI3K-Akt e possui propriedades antioxidantes. Tais características fizeram suscitar alguns estudos sobre o seu uso na cicatrização corneana.^{13,14,15,16,17,18}

A NCG contribuiu na reepitelização da córnea de ratos saudáveis tratados comparados ao controle. Quando utilizada em cachorros saudáveis para avaliar olho seco e sensibilidade corneana, não foi observada diferença nos grupos. Em contrapartida, em pacientes com úlceras neurotróficas (UN) de etiologias variadas a NCG auxiliou na resolução das mesmas.^{17,19,20}

Diante das evidências da ação estimulante da NCG no processo cicatricial da córnea em animais saudáveis, este estudo objetivou avaliar o potencial cicatrizante da NCG em córneas de ratos diabéticos, avaliando a capacidade da mesma em promover a reepitelização completa de úlceras de córnea (UC) secundárias a CD.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se a nicergolina é capaz de estimular a reepitelização de úlceras de córnea em ratos diabéticos portadores de ceratopatia diabética.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar se a taxa de reepitelização completa da córnea em 72h em cobaias que receberam nicergolina é superior à taxa do grupo que recebeu placebo;
- Analisar se a área do defeito epitelial da córnea em 72h em cobaias que receberam nicergolina é inferior à taxa do grupo que recebeu placebo;
- Analisar se a velocidade de reepitelização da córnea em 72h em cobaias que receberam nicergolina é superior à taxa do grupo que recebeu placebo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A capacidade de cicatrização dos tecidos é uma função inerente aos órgãos e é de particular importância no segmento anterior do olho, pois a córnea responde pela função de proteção das estruturas internas oculares.²¹

As doenças da córnea respondem pela quinta maior causa de cegueira no mundo, contabilizando cerca de 4.5 milhões de pessoas cegas sendo a etiologia desta cegueira resultante de infecções e trauma na superfície ocular, principalmente nos continentes africano e asiático. Reiterando tal fato, apenas nos EUA ocorrem cerca de 30.000 transplantes de córnea anualmente para reabilitação visual, sendo, portanto, essencial o entendimento do processo de cicatrização corneana.²¹

O epitélio da córnea é do tipo estratificado, escamoso, não queratinizado. Possui de cinco a seis camadas, sendo a camada superficial composta de células achatadas e nucleadas, as camadas intermediárias são em número de duas a três e compostas de células aladas e, por fim, a camada basal que está próxima a membrana basal. Sua espessura é de 50 a 60µm e suas células são unidas umas às outras por complexos juncionais denominados desmossomos, enquanto que a união das células à membrana basal se dá por hemidesmossomos. Sua camada superficial possui microvilos que estabilizam o filme lacrimal pré-corneal.²²

Novas células são derivadas de atividade mitótica, principalmente no limbo da córnea, rico em células-tronco, e na camada basal e esta atividade orienta as células em direção superficial e centrípeta. O epitélio corneano responde rapidamente a defeitos na sua integridade através de movimentos amebóides celulares em direção à margem da ferida seguidos de replicação celular local, processo esse que varia de sete a quatorze dias.²²

Estudos revelam que durante a cicatrização epitelial da córnea, fatores de crescimento, neurotrofinas e citocinas são importantes reguladores que estimulam a proliferação, migração, diferenciação, adesão, deposição de matriz extracelular e regulação de proteases celulares envolvidas no processo.²³

As células da córnea expressam muitos fatores de crescimento tais como: epidermal growth fator (EGF), platelet-derived growth fator (PDGF), transforming growth fator (TGF), fibroblast growth fator (FGF), insulin-like 1 growth factor (IGF-1), nerve growth fator (NGF), Substância P (SP), vascular endotelial growth fator (VEGF) interleucinas (IL) 1,6 e 10, dentre outros. Esses fatores são ativados e

liberados durante a injúria corneana para reparo tecidual através de interação harmoniosa entre células epiteliais, estromais e terminações nervosas do plexo sub-basal corneano.²³

O Diabetes Mellitus é uma patologia sistêmica de grande notoriedade devido a sua elevada prevalência estimada em 451 milhões de pacientes em 2017 no mundo inteiro.²⁴ O diabetes causa morbidade ocular não apenas devido à retinopatia diabética e à catarata, mas também devido ao acometimento corneano por meio da ceratopatia diabética.²⁴

A CD é uma patologia que acomete mais de 2/3 dos pacientes diabéticos durante o curso natural da doença e responde por uma síndrome composta de prejuízo na sensibilidade corneana, redução da secreção lacrimal, ceratites punctatas, erosões recorrentes epiteliais e úlceras de córnea que não cicatrizam ou quando o fazem, é de maneira muito lenta. Os gatilhos para esse cenário são traumas epiteliais intra perátorios, como, por exemplo, desepitelizações que ocorrem durante cirurgias como vitrectomias, refrativas e de catarata. Essa conjuntura eleva o risco do surgimento de ceratites infecciosas, perfuração ocular e consequentemente cegueira temporária ou permanente nestes pacientes.^{1, 9, 25}

A fisiopatogênese da CD é centrada na disfunção celular induzida pela hiperglicemia, a qual gera mudanças no estrato epitelial corneano com espessamento na membrana basal epitelial, queda do número de hemidesmossomos, deposição de produtos finais de glicação avançada, queda na densidade de células basais epiteliais e degeneração das mesmas, aumento da atividade de metaloproteinases de matriz e glicosiltransferases, afinamento epitelial, deposição anormal de laminina e colágeno IV, deficiência na eliminação de espécies reativas de oxigênio, queda na função de células tronco limbares, dentre outros agravos.^{25,26,27}

Os nervos corneanos são derivados da divisão oftálmica do trigêmeo e respondem pela sensibilidade corneana, sensação de olho seco, temperatura, toque e dor, além de participarem da produção lacrimal, reflexo do piscar e cicatrização corneana. Troncos nervosos adentram na córnea através do limbo no estroma médio, formando o plexo nervoso estromal, ramificam-se e ascendem até a região subepitelial, formando o denso plexo nervoso subepitelial.²⁸

O diabetes causa uma disfunção nos nervos do corpo inteiro, a chamada neuropatia periférica diabética (NPD), cujo componente corneano recebe o nome

ceratopatia neurotrófica diabética, uma das complicações mais debilitantes da doença e que acomete mais de 50% de todos os diabéticos. Estudos in vivo sugerem ainda alterações nervosas tais como: afilamento de fibras nervosas, queda da densidade do plexo nervoso, edema de axônios, distribuição irregular de fibrilas, degeneração nas células basais de Schwann e anormalidades mitocondriais.^{29,30}

A NPD pode ser dividida em duas fases: uma fase precoce e outra tardia. A fase precoce é uma neuropatia metabólica reversível, enquanto que a fase tardia ocorre com a persistência do processo e cursa com alterações degenerativas, redução dos níveis de acetilcolina nos terminais e, finalmente, perda de fibras nervosas.³¹

He J. et al demonstrou que, após 10 semanas da administração de estreptozocina, o grupo dos ratos diabéticos apresentou queda da sensibilidade corneana avaliada pelo estesiômetro de cochet-bonnet e queda na densidade dos nervos do plexo basal subepitelial no grupo diabético comparado ao controle. Estudos prévios mostram que tal evento pode ocorrer até com 8 semanas pós-indução do diabetes. O primeiro estudo mostrou ainda que o tempo de reepitelização completa corneana está lentificado em animais diabéticos, sendo de 61.3 ± 4.32 horas comparado aos animais saudáveis, nos quais esta mesma variável é de aproximadamente 46 a 52 horas.^{4,28,32}

A integridade da cicatrização corneana depende do harmonioso equilíbrio entre a produção de fatores de crescimento pelas células corneanas e a produção de neurotransmissores e peptídeos pelos terminais nervosos.^{9,32}

Sarkar J. et al mostrou que os níveis de NGF, CNF, VEGF e IL-6 estavam elevados em resposta a injúria corneana em córneas normoglicêmicas, enquanto que os mesmos fatores de crescimento estavam significativamente suprimidos em córneas hiperglicêmicas.³³

Portanto, é inegável a interdependência entre o metabolismo da glicose em funcionamento perfeito e a regulação de fatores de crescimento e citocinas expressados por nervos e células corneanas para existir uma cicatrização corneana eficaz.^{1,5,9}

O tratamento da ceratopatia e neuropatia diabética é um desafio visto que as terapias convencionais não conseguem tratar eficazmente por não atuar na fisiopatogênese de tais entidades. Medidas como: lubrificantes, géis, antibióticos tópicos, lentes de contato terapêuticas, tarsorrafia, dentre outras, apenas propiciam

um melhor ambiente em termos de superfície ocular, mas não resolvem a dificuldade de reepitelização e a degeneração nervosa.^{1,4,9}

Potenciais novos tratamentos para ceratopatia e neuropatia diabética têm elencado a temática de pesquisas científicas. Um estudo recente mostrou que a aplicação tópica de peptídeo derivado da fibronectina foi capaz de acelerar a reepitelização corneana em ratos diabéticos.^{34,35}

A SP é um neuropeptídeo produzido no núcleo do trato solitário no tronco cerebral. Sua regulação e liberação é feita pelo sistema dopaminérgico sendo encontrada na córnea nos terminais nervosos do plexo corneano. A concentração de SP está diminuída no filme lacrimal de pacientes com prejuízo na sensibilidade corneana.^{12,28}

Estudos controlados em animais diabéticos e culturas celulares mostram que a aplicação tópica de SP acelerou o fechamento de defeito epiteliais corneanos, aumentou os níveis de fosforilação da via do PI3K-Akt, reduziu a produção de radicais livres de oxigênio e atenuou o dano mitocondrial. A SP apresenta a desvantagem de ser uma molécula instável sob a forma de colírio, sofrendo rápida degradação por neuropeptídeos, além de efeitos colaterais desconfortáveis como a miose.¹²

A Naltrexona, um inibidor do fator de crescimento dos opióides, é capaz de acelerar a cicatrização em córneas diabéticas de ratos, coelhos e culturas celulares. De maneira semelhante, a combinação do fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF) com ácido docosahexaenóico (DHA) também se mostrou positiva na cicatrização corneana. Seguindo a mesma linha, inibidores da aldose-redutase parecem atuar na redução de alterações corneanas induzidas pelo diabetes.^{4,11,36}

O fator de crescimento de nervos ou NGF pertence à família das neurotrofinas, que são proteínas expressadas pelas células da córnea, conjuntiva e glândula lacrimal e medeiam a interação entre epitélio e nervos corneanos na cicatrização através dos seus receptores p75 e o tropomyosin receptor kinase A (TrKA).³⁷ Além disso, o NGF promove o crescimento e a homeostase de neurônios simpáticos e sensitivos e a diferenciação dos neurônios no sistema nervoso central. A via fundamental que contribui para todas essas ações opera através da ligação do NGF ao TrKA levando a ativação do fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K) que acarreta na ativação da sinalização PI3K-Akt.^{34,36,37}

A dificuldade na cicatrização corneana em indivíduos com diabetes parece

surgir de defeitos na sinalização da via do PI3K-Akt devido à deficiência ou intolerância à insulina, pois a mesma é um regulador chave nessa sinalização. Essa via de transdução de sinal atua mediante a estimulação do epidermal growth factor (EGF) e seu receptor EGFR, fundamentais para cicatrização corneana.^{9,12}

De maneira semelhante, outros estudos mostram que esta via PI3K-Akt está suprimida em culturas corneanas epiteliais submetidas a altas concentrações de glicose, e que nessas culturas há um atraso na cicatrização corneana.^{9,12, 34}

A aplicação de colírio à base de NGF murino em úlceras neurotróficas moderadas de 45 olhos humanos contribuiu na melhora da sensibilidade e na reepitelização corneana completa em 12 a 42 dias. O mesmo apresenta como desvantagem o seu alto custo e efeitos colaterais como alodínea e hiperemia conjuntival.^{36,38}

A Nicergolina (10a-methoxy-1,6-dimethylergoline-8-methanol-5-bromonicotinate, Sermion®, Biogenesis AntiAging, Fish Hoek, África do Sul) é um derivado do ergot que se decompõe em vários metabólitos com ações neurofarmacológicas múltiplas, após administração oral. Tais ações consistem em melhorar a captação e o consumo de glicose cerebral, atuar na biossíntese de proteínas e de ácidos nucleicos bem como modular vários sistemas de neurotransmissão.^{13,39}

Tais propriedades fizeram da Nicergolina uma droga segura e amplamente usada na neurologia para o tratamento de transtornos metabólico-vasculares cerebrais agudos e crônicos como arteriosclerose cerebral, trombose, embolia cerebral, demências senis e pré-senis e isquemia cerebral transitória.¹⁴

Seu vasto mecanismo de ação consiste em: antagonista α -1-adrenérgico, gerando vasodilatação; regulador da função de neurotransmissores colinérgicos aumentando os níveis de acetilcolina nos terminais nervosos; inibidor da agregação plaquetária; promotor de elevação nos níveis de NGF e de SP séricos; agonista dopaminérgico no sistema nervoso central, além de possuir propriedades antioxidantes.

Devido a sua versatilidade de ação, a NCG é também utilizada em outras doenças, tais como desordens do equilíbrio, disfagia, glaucoma, prurido e hiperplasia prostática benigna.^{13,40}

Estudos in vivo mostram que o tratamento com a Nicergolina induz elevações

importantes dos níveis de NGF e BDGF no córtex frontal cerebral de ratos idosos, além de promover a homeostase de neurônios colinérgicos, por meio da redução da atividade da acetilcolinesterase, prevenindo a redução dos níveis de acetilcolina relacionados à idade. Também foi comprovado o aumento nos níveis de substância P em pacientes pós-acidente vascular cerebral isquêmico com o tratamento com Nicergolina.^{15,16,17,18,39}

A ação da Nicergolina na elevação do NGF, substância P e no aumento dos níveis de acetilcolina fez suscitar alguns estudos sobre o seu uso na cicatrização corneana e regeneração nervosa.

A NCG contribuiu na taxa de fechamento de úlceras epiteliais corneanas em ratos saudáveis, comparados ao placebo, aumentando também os níveis de NGF no tecido corneano.¹⁶ Após cirurgia refrativa e tratamento com NCG, ratos saudáveis apresentaram aumento dos níveis de SP e outros marcadores neurais, como o peptídeo do gene da calcitonina e a b-tubulina na córnea, mas não apresentaram melhora na taxa de reepitelização corneana comparado ao grupo placebo.¹⁷

Aumento da concentração sérica de SP em pacientes tratados com NCG pós-acidente vascular cerebral foi demonstrado em ensaio clínico randomizado e tal aumento decorreu do fato de a NCG ser um agonista dopaminérgico que elevou a liberação de SP. Resultado semelhante também foi encontrado em outro estudo em pacientes com disfagia.^{15,18}

Diminuição da produção de radicais livres de oxigênio e de marcadores de inflamação e aumento dos níveis de insulina foram observados nas células hipocâmpais de ratos portadores de doença de Alzheimer tratados com NCG. Tais resultados foram acompanhados de ativação da via de transdução do PI3K-Akt.^{14,39}

Analisando-se em conjunto todas estas evidências, aventou-se a hipótese diagnóstica de uma ação positiva da NCG na cicatrização de córnea no contexto do Diabetes Mellitus. O presente estudo foi desenhado objetivando-se avaliar a ação da Nicergolina no DM, pois não há pesquisas dessa droga em animais diabéticos, com o intuito de investigar se a mesma seria capaz de promover a completa reepitelização e resolução de úlceras de córnea em animais com ceratopatia diabética.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DECLARAÇÃO ÉTICA

Os animais utilizados foram submetidos a procedimentos experimentais para fins de pesquisa científica, de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em reunião de 29 de agosto de 2018 e registrada com nº 569 570 0021/2018. Todos os procedimentos considerando animais, neste estudo, aderiram a resolução da ARVO para o cuidado e uso de animais em pesquisas visuais

4.2 MODELO EXPERIMENTAL

Os animais foram adquiridos através do Biotério do departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco e foram alojados no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA. O desenho do estudo foi de uma pesquisa experimental, controlada e duplo-cega, com quarenta e oito (48) ratos (*rattus norvegicus*) machos da espécie Wistar de 08-10 semanas de vida e pesando por volta de 200-300 g cada. Os mesmos não apresentavam nenhuma modificação genética e possuíam status vacinal completo. Todos os animais tiveram livre acesso à ração apropriada e à água e estiveram alojados em gaiolas (04 ratos por gaiola) com cama de maravalha, em condições controladas de temperatura ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e com ciclo luz-escuro de 12h (luz ligada às 08:00h e desligada às 20:00h).

4.3 INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS

Os animais foram alojados em gaiolas uma semana antes do início do experimento de indução do diabetes. Os mesmos foram induzidos ao desenvolvimento de Diabetes Mellitus através de uma dose única de 60mg.kg^{-1} de estreptozocina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), em uma solução tamponada com citrato de sódio 0.5M e de Ph4.5 (Alfa Aesar™ Citrate, Fischer Scientific, Hampton,

New Hampshire, EUA).⁴¹

Foram utilizadas seringas de 1ml (26G) para a injeção via intraperitoneal da solução estreptozocina-tampão, após os animais terem permanecido 12 horas sem ingesta de alimentos, porém com livre acesso à água. A indução do diabetes por STZ é um procedimento que deflagra dor mínima e, portanto, não necessita de anestesia, segundo protocolos experimentais.⁴¹

O peso e a glicemia dos animais foram monitorizados periodicamente. O diabetes foi confirmado através da medida da glicemia de amostra de sangue venoso da veia caudal, após 08 horas de jejum com glicosímetro (Free Style Lite, Abbott, Chicago, Illinois, EUA), depois de 5 dias da indução, sendo positivo se maior ou igual a 200mg/dl. Quarenta e oito animais cuja glicemia foi maior ou igual a 200mg/dl foram incluídos no estudo e randomicamente divididos em 02 grupos, o grupo nicergolina (n=24) e o grupo placebo (n=24).

4.4 EXPOSIÇÃO

Os 48 ratos diabéticos foram submetidos à exposição, após cerca de 06 semanas da indução. Um pesquisador mascarado administrou, via oral, placebo em um grupo e nicergolina no outro grupo, na dose 10mg.kg⁻¹.dia⁻¹ por 15 dias, sendo essa dose e posologia estabelecida de acordo com estudos prévios.^{16,17}

Para administração, a NCG foi reconstituída com 0,1 N de HCL 03mL e diluída com água. No grupo do placebo, foi administrado apenas 0,1N HCL 03mL diluído com a mesma quantidade de água. A administração via oral do tratamento e do placebo se deu através de cânula apropriada para alimentação, pelo método de gavagem e com contenção manual.¹⁶

Como a dose administrada nos animais de Nicergolina foi de 10mg.kg⁻¹.dia⁻¹ e a sua biodisponibilidade é de apenas 5%, optou-se por fazer uma dose de ataque da NCG durante os 15 dias anteriores à cirurgia com o objetivo de manter níveis séricos elevados da mesma por um tempo prolongado.^{16, 40}

Optou-se por não administrar a NCG no período de pós-operatório, pois, neste período, os animais estavam sob anestesia/sedação periódica em virtude da coleta de dados.

4.5 CIRURGIA

Imediatamente após o término da exposição (nicergolina X placebo), os animais foram submetidos à anestesia com Cloridrato de Quetamina a 10% (Cetamin, Syntec, São Paulo, Brasil) na dose de 50 mg/kg e Cloridrato de Xilazina a 2% (Xilazin, Syntec, São Paulo, Brasil) na dose de 10 mg/kg, por via intramuscular, e aplicação tópica de colírio de Hidroclorido de Oxibuprocaina 0,4% (Oxinvest, Cristália Prod. Quim. Farm. Ltda, São Paulo, Brasil) no olho esquerdo (OE). Após a anestesia, o OE foi submetido à cirurgia de ceratectomia superficial, por pesquisador mascarado.

No intraoperatório, o tamanho da injúria epitelial corneana a ser confeccionada foi pré-estabelecido através de marcação com um trépano de córnea (Odous Instrumentos Ltda, Contagem, MG, Brasil) de 03mm. A área delimitada pelo trépano foi, então, desepitelizada com anel de polimento corneano (AlgerBrush II, Alger company, Lago Vista, TX), gerando um defeito corneano central de 03mm de diâmetro, como previamente descrito.^{4,16,34}

4.6 ANÁLISE DA REEPITELIZAÇÃO DA CÓRNEA

Para acompanhamento da reepitelização corneana, os animais foram anestesiados de maneira semelhante a anestesia realizada para a cirurgia, tendo sido avaliados em intervalos de tempo pré-determinados.

As fotografias da córnea foram feitas imediatamente após a cirurgia (0 hora) e nos intervalos de tempo de 12/24/48/72 horas por pesquisador mascarado. O defeito epitelial foi avaliado através da coloração com fluoresceína sódica 1% sob filtro azul de cobalto e fotografado com uma câmera digital Canon EOS Rebel T5i/EOS 700 D acoplada por meio de adaptador apropriado no microscópio cirúrgico Opto SM Plus IBZ. A área do defeito epitelial foi medida, por outro pesquisador mascarado, pela análise das fotografias com auxílio do programa Adobe Photoshop.^{4,16,34}

Após 72h da cirurgia, os animais foram eutanasiados com pentobarbital sódico a 3% (Hipnol, Syntec, São Paulo, Brasil) na dose de 150mg.kg⁻¹, por via intramuscular, e monitorizados até que ocorresse a parada dos batimentos cardíacos.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estatísticos descritivos foram calculados. O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi realizado para dados contínuos. Assim, utilizou-se médias e desvios-padrão (DP) para dados normalmente distribuídos, e medianas e intervalos interquartis (IIQ), para dados que não eram normalmente distribuídos. As diferenças entre grupos de variáveis contínuas foram comparadas usando o teste T de amostras independentes, para dados normalmente distribuídos ou usando o teste U de Mann-Whitney, para dados que não eram normalmente distribuídos.

A probabilidade de reepitelização completa da córnea em 72 horas foi avaliada pelo teste de log-rank da análise de sobrevivência de Kaplan-Meier. O teste para análise multivariada foi realizado com a análise de regressão de Cox. Realizaram-se as análises por meio do programa SPSS, versão 21 (IBM Corporation, Armonk, NY, 672 EUA). Os valores de P foram bicaudais e a significância estatística foi estabelecida em 0.05.

5 RESULTADOS

Os dados demográficos dos animais, plotados na tabela 1, demonstram a homogeneidade dos dois grupos quanto à glicemia no grupo placebo (351 ± 81 mg/dl, $n = 24$) e no grupo NCG (314 ± 66 mg/dl, $n = 24$, $P = 0.85$); peso no grupo placebo (230 ± 39 g, $n = 24$) e no grupo NCG (247 ± 34 g, $n = 24$, $P = 0.103$) e duração do diabetes no grupo placebo (6 ± 2 semanas, $n = 24$) e no grupo NCG (5 ± 2 semanas, $n = 24$, $P = 0.170$).

Tabela 1. Dados demográficos dos animais diabéticos

Valores Clínicos	Placebo (n=24)	Nicergolina (n=24)	P Valor
Glicemia ^a , média (DP ^c), mediana (IIQ ^d), mg/dL	351 (81), 308 (156)	314 (66), 309 (95)	.085 ^e
Peso ^a , média (DP ^c), mediana (IIQ ^d), g	230 (39), 230 (68)	247 (34), 250 (53)	.103 ^e
Duração do diabetes ^b , média (DP ^c), mediana (IIQ ^d), semanas	6 (2), 4 (3)	5 (2), 6 (4)	.170 ^f

^adistribuição normal de dados, ^bdistribuição não normal de dados, ^cdesvio padrão, ^dintervalo-interquartil, ^eteste T para amostras independentes, ^fTeste Mann-Whitney's *U*.

Dos 24 animais em cada grupo, 4/24 (17%) no grupo placebo e 12/24 (50%) no grupo NCG atingiram reepitelização completa da córnea dentro de 72h (log-rank = 0.027). A análise da regressão de Cox não mostrou influência das covariáveis glicemia ($P = 0.601$), peso ($P = 0.322$) e duração do diabetes ($P = 0.208$) na curva de sobrevivência da variável reepitelização corneana.

O progresso da reepitelização da área da UC está detalhado na tabela 2. Nessa tabela, observa-se que a área da UC no intervalo de tempo 0 hora, imediatamente após a realização da cirurgia, é homogêneo nos dois grupos, sendo no grupo placebo de 6.42 ± 1.17 mm², $n = 24$ e no grupo NCG de 6.07 ± 1.31 mm²,

$n = 24$, $P = 0.330$. Em adição, a partir da tabela 2, pode-se observar que a área da UC é significativamente menor no grupo da NCG em vários intervalos de tempo. No intervalo de tempo de 12h, a área UC do grupo NCG ($4.71 \pm 1.53 \text{ mm}^2$, $n = 24$) foi menor comparada a área da UC do grupo placebo ($5.69 \pm 0.99 \text{ mm}^2$, $n = 24$, $P = 0.018$).

O mesmo ocorreu no intervalo de tempo de 24h, com a área da UC no grupo NCG ($3.15 \pm 1.65 \text{ mm}^2$, $n = 24$), mostrando-se menor comparada a do grupo placebo ($4.52 \pm 1.56 \text{ mm}^2$, $n = 24$, $P = 0.012$). Tal efeito também se repetiu no intervalo de tempo de 72h, no qual a área da UC no grupo NCG ($1.24 \pm 0.87 \text{ mm}^2$, $n = 24$) foi consideravelmente menor comparada a área da UC no grupo placebo ($3.51 \pm 3.48 \text{ mm}^2$, $n = 24$, $P = 0.017$).

Tabela 2. Progresso da reepitelização corneana em ratos diabéticos que se submeteram a debridamento mecânico após tratamento com nicergolina ou placebo.

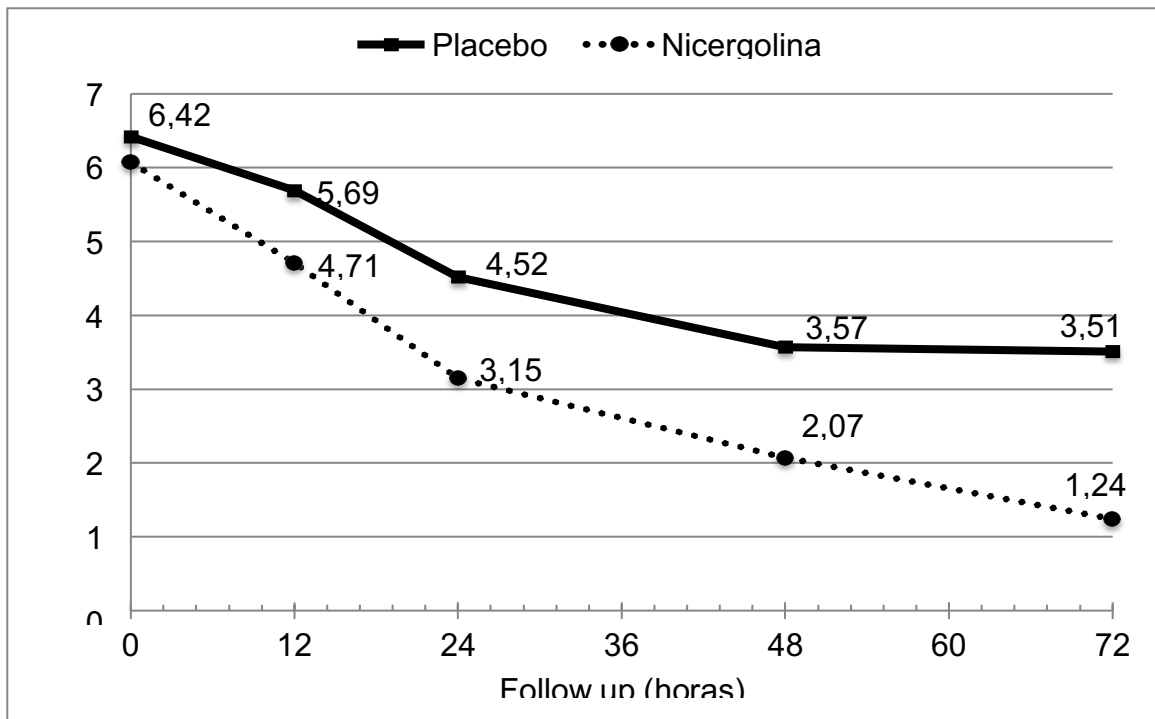
Intervalo de Tempo	Área do defeito epitelial, média (DP c), mediana (IIQd), mm2		P Valor
	Placebo	Nicergolina	
0 h ^a	6.42 (1.17), 6.20 (1.28)	6.07 (1.31), 6.07 (1.27)	.330 ^e
12 h ^a	5.69 (0.99), 5.40 (0.78)	4.71 (1.53), 4.68 (2.51)	.018 ^e
24 h ^a	4.52 (1.56), 4.45 (2.36)	3.15 (1.65), 3.30 (3.08)	.012 ^e
48 h ^b	3.57 (3.21), 1.67 (4.52)	2.07 (1.41), 0.50 (2.00)	.095 ^f
72 h ^b	3.51 (3.48), 0.97 (4.38)	1.24 (0.87), 0.00 (0.72)	.017 ^f

^adistribuição normal de dados, ^bdistribuição não normal de dados, ^cdesvio padrão, ^dintervalo-interquartil, ^eteste T para amostras independentes, ^fTeste Mann–Whitney's U.

Na figura 1, pode-se comparar o progresso da reepitelização da córnea nos dois grupos. A figura 2 exhibe um exemplo da coloração com fluoresceína 1% do defeito epitelial corneano nos ratos do grupo nicergolina e placebo imediatamente após a cirurgia e nos intervalos de tempo de 12 /24 /48 /72 horas após. A mediana e

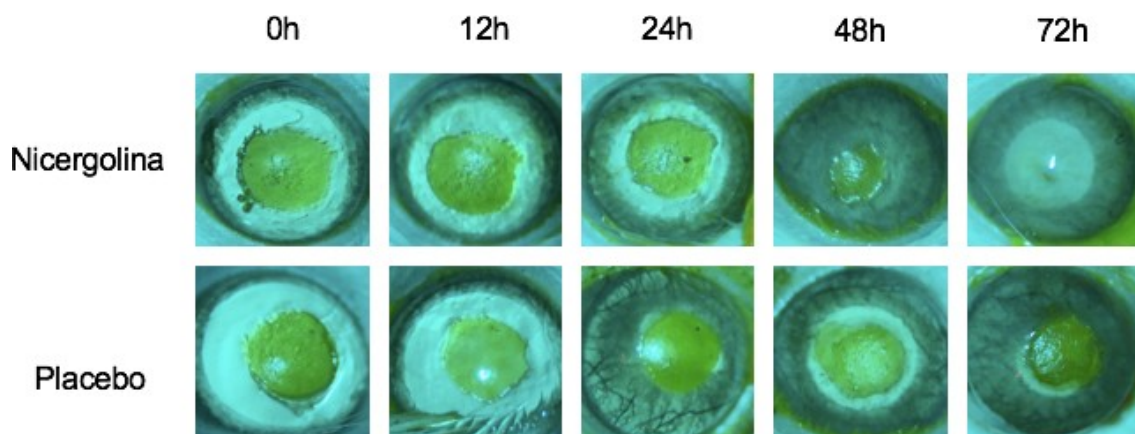
o intervalo interquartil (IIQ) da velocidade de reepitelização no grupo placebo nas primeiras 72 horas foi de 0.04 (0.06) mm²/h, enquanto no grupo NCG a mesma variável foi de 0.08 (0.03) mm²/h (P = 0.055).

Figura - 1. Progresso da reepitelização corneana em ratos diabéticos submetidos a desbridamento mecânico após tratamento com nicergolina ou placebo.



Fonte : Portela,2020

Figura - 2. Representação da coloração com fluoresceína do defeito epitelial corneano nos ratos do grupo nicergolina e placebo nos intervalos de tempo de 0/12/24/48/72 horas após.



Fonte: Portela,2020

6 DISCUSSÃO

No presente estudo utilizou-se um modelo experimental que reproduziu a clínica do diabetes do tipo 1, insulino-dependente, uma vez que os animais apresentaram defeitos epiteliais difíceis de cicatrizar por completo, reproduzindo a clínica de úlceras decorrentes de ceratopatia diabética.

Considerando o objetivo geral do presente estudo, pode-se concluir, baseado nos resultados da tabela 2, que a nicergolina, de fato, estimulou a reepitelização da córnea em ratos diabéticos, pois observou-se que o uso da mesma reduziu a área da ferida corneana no grupo tratado nos variados intervalos de tempo ao longo de 72h, quando comparado ao grupo que recebeu placebo.

Em relação aos objetivos específicos do presente estudo e considerando a área do defeito epitelial, verificou-se que o grupo NCG apresentou uma diminuição estatisticamente significativa na área da UC nos intervalos de tempo de 12h ($P = 0.018$), 24h ($P = 0.012$) e 72h ($P = 0.017$). Tais evidências sugerem que a NCG é um agente promotor da cicatrização epitelial corneana em ratos diabéticos, podendo ser considerada uma nova opção terapêutica a ser melhor investigada.

Considerando a velocidade de reepitelização das UC nos dois grupos, concluiu-se neste desfecho, que, embora o valor de $P = 0.055$, houve significância clínica, já que a velocidade foi 2x maior. Estudos semelhantes encontraram aumento dessa velocidade em 1.55 vez com o colírio de peptídeo derivado da fibronectina e 1.47 vez com o colírio de SP combinado com insulin-like growth factor-1.³⁴

Em se tratando da capacidade de reepitelização completa das UC nos dois grupos, a NCG se mostrou significativamente superior em contribuir para o fechamento das úlceras de córnea considerando que 12/24 animais (50%) do grupo NCG apresentaram resolução completa da UC, enquanto que apenas 4/24 (17%) dos animais do grupo placebo apresentaram o mesmo desfecho em 72h (Log-rank = 0.027). Estudos prévios reiteram de maneira semelhante ao presente estudo um atraso na reepitelização de defeitos da córnea em ratos diabéticos, com persistência dos mesmos sem cicatrização completa após 72h, algumas vezes ultrapassando 120h.^{10,42}

Este é o primeiro estudo experimental, controlado e duplo-cego, até a presente data, a investigar a ação da NCG como droga capaz de induzir elevação na taxa de reepitelização corneana e fechamento de úlceras de córnea em um contexto

clínico de diabetes, pois os demais estudos na literatura avaliaram esta droga apenas em animais saudáveis.^{13,14,19}

O atual estudo apresentou algumas limitações. Dentre elas pode-se citar a não comprovação da neuropatia diabética por teste objetivo, como, por exemplo, o teste de sensibilidade corneana com o estesiômetro de cochet-bonnet. Foi optado por não realizar o mesmo devido à baixa sensibilidade e reprodutibilidade do teste.^{43,44}

Uma segunda limitação foi a realização da exposição (nicergolina x placebo), antes da injúria cirúrgica corneana. A NCG apresenta biodisponibilidade de apenas 5% da dose inicial, portanto, foi feita uma dose de ataque com a mesma 15 dias antes da cirurgia para compensação desse fator, sendo este protocolo baseado em estudos prévios.^{16,40}

Outra limitação do estudo foi a não comprovação da elevação dos níveis de SP ou NGF séricos ou no tecido corneano dos animais após o tratamento com NCG. Em adição, como descrito acima, esse aumento de SP e NGF no tecido corneano pós tratamento com NCG foi constatado em animais saudáveis.¹⁶

Em conclusão, a nicergolina demonstrou-se superior em contribuir para a reepitelização corneana completa e o fechamento de feridas epiteliais de córnea em ratos diabéticos, quando comparada ao placebo. A partir dessa evidência, mais estudos se fazem necessários para avaliar a nicergolina como potencial tratamento em úlceras de córnea secundárias a ceratopatia diabética.

7 CONCLUSÃO

- A taxa de reepitelização completa da córnea em 72h em cobaias que receberam nicergolina é superior à taxa correspondente do grupo que recebeu placebo;
- A área do defeito epitelial da córnea em 72h em cobaias que receberam nicergolina é inferior a área correspondente do grupo que recebeu placebo;
- A velocidade de reepitelização da córnea em 72h em cobaias que receberam nicergolina é clinicamente superior à velocidade correspondente do grupo que recebeu placebo.

REFERÊNCIAS

1. Curie M. Wastewater renovation and reuse: proceedings of the International Conference on the renovation and reuse of the wastewater through aquatic and terrestrial systems. Frank M. DÍtri, Michigan State University, Rockefeller Foundation. 1977;iii.
2. Priyadarsini S, Whelchel A, Nicholas S, Sharif R, Riaz K, Karamichos D. Diabetic keratopathy: Insights and challenges. *Surv Ophthalmol*. 2020;65(5):513-529. 851
3. Xu KP, Li Y, Ljubimov AV, Yu FS. High glucose suppresses epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and attenuates corneal epithelial wound healing. *Diabetes*. 2009;58(5):1077-1085.
4. Zhao H, He Y, Ren YR, Chen BH. Corneal alteration and pathogenesis in diabetes mellitus. *Int J Ophthalmol*. 2019;12(12):1939-1950.
5. He J, Pham TL, Kakazu A, Bazan HEP. Recovery of Corneal Sensitivity and Increase in Nerve Density and Wound Healing in Diabetic Mice After PEDF Plus DHA Treatment. *Diabetes*. 2017;66(9):2511-2520.
6. Di Zazzo A, Coassin M, Varacalli G, Galvagno E, De Vincentis A, Bonini S. Neurotrophic keratopathy: Pros and cons of current treatments. *Ocul Surf*. 2019;17(4):619-623.
7. Maycock NJ, Marshall J. Genomics of corneal wound healing: a review of the literature. *Acta Ophthalmol*. 2014;92(3):e170-e184.
8. Ljubimov AV, Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing. *Prog Retin Eye Res*. 2015;49:17-45.
9. Park JH, Kang SS, Kim JY, Tchah H. Nerve Growth Factor Attenuates 867 Apoptosis and Inflammation in the Diabetic Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(15):6767-6775.
10. Ljubimov AV. Diabetic complications in the cornea. *Vision Res*. 2017;139:138-152. 39.
11. Takamura Y, Matsumoto T, Tomomatsu T, Matsumura T, Takihara Y, Inatani M. Aldose reductase inhibitor counteracts the enhanced expression of matrix metalloproteinase-10 and improves corneal wound healing in galactose-fed rats. *Mol Vis*. 2013;19:2477-2486.
12. Zagon IS, Sassani JW, Immonen JA, McLaughlin PJ. Ocular surface abnormalities related to type 2 diabetes are reversed by the opioid antagonist

- naltrexone. *Clin Exp Ophthalmol*. 2014;42(2):159-168.
13. Yang L, Di G, Qi X, et al. Substance P promotes diabetic corneal epithelial wound healing through molecular mechanisms mediated via the neurokinin-1 receptor. *Diabetes*. 2014;63(12):4262-4274.
 14. Zajdel P, Bednarski M, Sapa J, Nowak G. Ergotamine and nicergoline - facts and myths. *Pharmacol Rep*. 2015;67(2):360-363.
 15. Zang G, Fang L, Chen L, Wang C. Ameliorative effect of nicergoline on cognitive function through the PI3K/AKT signaling pathway in mouse models of Alzheimer's disease. *Mol Med Rep*. 2018;17(5):7293-7300.
 16. Lee S, Na SH, Chung YA, Jeong H, Song IU. Efficacy of nicergoline treatment in Parkinson's disease associated with dementia. *J Clin Neurosci*. 2019;70:136- 139.
 17. Kim SY, Choi JS, Joo CK. Effects of nicergoline on corneal epithelial wound healing in rat eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(2):621-625
 18. Kim SY, Yang J, Lee YC. The effects of nicergoline on corneal nerve regeneration in rat corneas after photorefractive keratectomy. *Curr Eye Res*. 893 2011;36(1):29-33.
 19. Nishiyama Y, Abe A, Ueda M, Katsura K, Katayama Y. Nicergoline increases serum substance P levels in patients with an ischaemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2010;29(2):194-198.
 20. Sebbag L, Moody LM, Allbaugh RA, Mochel JP. Nerve growth factor in dogs: Assessment of two immunoassays and selected ocular parameters following a nicergoline challenge per os. *Vet Ophthalmol*. 2020;23(1):199-204.
 21. Lee YC, Kim SY. Treatment of neurotrophic keratopathy with nicergoline. *Cornea*. 2015;34(3):303-307.
 22. Mathews PM, Lindsley K, Aldave AJ, Akpek EK. Etiology of Global Corneal Blindness and Current Practices of Corneal Transplantation: A Focused Review. *Cornea*. 2018;37(9):1198-1203.
 23. Forrester, John V; Dick, Andrew D; Mcmenamin, Paul G; Lee, William R; *The Eye Basic Sciences in Practice*. 4 ed. United Kingdom: Elsevier, 2016. p. 14-20.
 24. Loureiro RR, Gomes JAP. Biological modulation of corneal epithelial wound healing. *Arq Bras Oftalmol*. 2019;82(1):78-84.
 25. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of

- diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018; 138:271-281.
26. Deák EA, Szalai E, Tóth N, Malik RA, Berta A, Csutak A. Longitudinal Changes in Corneal Cell and Nerve Fiber Morphology in Young Patients with Type 1 Diabetes with and without Diabetic Retinopathy: A 2-Year Follow-up Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60(2):830-837. 35
 27. Huang C, Liao R, Wang F, Tang S. Characteristics of Reconstituted Tight Junctions After Corneal Epithelial Wounds and Ultrastructure Alterations of Corneas in Type 2 Diabetic Rats. *Curr Eye Res.* 2016;41(6):783-790.
 28. Kramer AA, Bagherzadeh M, Maguen E, Rabinowitz YS, Ljubimov AV. Persistence of reduced expression of putative stem cell markers and slow wound healing in cultured diabetic limbal epithelial cells. *Mol Vis.* 2015;21: 1357-1367.
 29. Davidson EP, Coppey LJ, Shevalye H, Obrosova A, Kardon RH, Yorek MA. Impaired Corneal Sensation and Nerve Loss in a Type 2 Rat Model of Chronic Diabetes Is Reversible With Combination Therapy of Menhaden Oil, α -Lipoic Acid, and Enalapril. *Cornea.* 2017;36(6):725-731.
 30. Bikbova G, Oshitari T, Baba T, Yamamoto S. Neuronal Changes in the Diabetic Cornea: Perspectives for Neuroprotection. *Biomed Res Int.* 2016; 2016:5140823.
 31. Yorek MS, Obrosova A, Shevalye H, et al. Effect of diet-induced obesity or type 1 or type 2 diabetes on corneal nerves and peripheral neuropathy in C57Bl/6J mice. *J Peripher Nerv Syst.* 2015;20(1):24-31.
 32. Jende JME, Groener JB, Oikonomou D, et al. Diabetic neuropathy differs between type 1 and type 2 diabetes: Insights from magnetic resonance neurography. *Ann Neurol.* 2018;83(3):588-598.
 33. Davidson EP, Coppey LJ, Kardon RH, Yorek MA. Differences and similarities in development of corneal nerve damage and peripheral neuropathy and in diet-induced obesity and type 2 diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(3):1222-1230.
 34. Sarkar J, Chaudhary S, Jassim SH, et al. CD11b+GR1+ myeloid cells secrete NGF and promote trigeminal ganglion neurite growth: implications for corneal nerve regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(9):5920-36
 35. Morishige N, Uemura A, Morita Y, Nishida T. Promotion of Corneal Epithelial

- Wound Healing in Diabetic Rats by the Fibronectin-Derived Peptide PHSRN. *Cornea*. 2017;36(12):1544-1548.
36. Romano MR, Biagioni F, Carrizzo A, et al. Effects of vitamin B12 on the corneal nerve regeneration in rats. *Exp Eye Res* 2014;120: 109-117.
 37. Yu F., Yin J., Lee P.S., Hwang F., Mcdermott M., Sensory nerve regeneration after epithelium wounding in normal and diabetic corneas. *Expert review of Ophthalmology*.2015; 10:4, 383-392.
 38. Blanco-Mezquita T., Martinez-Garcia C., Proença R., Zieske JD, Bonini S, Lambiase A, Merayo-Llves J, Nerve growth factor promotes corneal epithelial migration by enhancing expression of matrix metalloproteinase-9. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;4;54(6):3880-90. 955
 39. Di G., Qi X., Zhao X., Zhang S., Danielson P., Zhou Q. Corneal epithelium-6 derived neurotrophic factors promote nerve regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017; 1;58(11):4695-4702.
 40. Wang B, Zhong L, Qiao P, Ma Z. Clinical efficacy and safety of nicergoline combined with oxiracetam in the treatment of vascular cognitive impairment. *Pak J Pharm Sci*. 2020;33(1(Special)):417-422.
 41. Winblad B, Fioravanti M, Dolezal T, et al. Therapeutic use of nicergoline. *Clin Drug Investig*. 2008;28(9):533-552.
 42. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015;70:5.47.1-5.47.20.
 43. Moore K, Ghatnekar G, Gourdie RG, Potts JD. Impact of the controlled release of a connexin 43 peptide on corneal wound closure in an STZ model of type I diabetes. *PLoS One*. 2014;9(1):e86570.
 44. Lum E, Murphy PJ. Effects of ambient humidity on the Cochet-Bonnet aesthesiometer. *Eye (Lond)*. 2018;32(10):1644-1651.
 45. Golebiowski B, Papas E, Stapleton F. Assessing the sensory function of the ocular surface: implications of use of a non-contact air jet aesthesiometer versus the Cochet-Bonnet aesthesiometer. *Exp Eye Res*. 2011;92(5):408–413.

ANEXO – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: 2126 8842
ciba@ufpe.br

Recife, 30 de agosto de 2018

Ofício nº 74/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Rodrigo Pessoa Cavalcante Lira**
Centro de Biociências
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0021/2018

Certificamos que a proposta intitulada, "**O papel da Nicergolina na promoção da cicatrização corneana em ratos diabéticos**". Registrada com o nº0021/2018 sob a responsabilidade de **Prof. Rodrigo Pessoa Cavalcante Lira** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 29/08/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2018 a 01/12/2018
Espécie/linhagem/raça	Ratos isogenico
Nº de animais	46
Peso/Idade	250-300g/ 04 semanas
Sexo	Machos
Origem	Departamento de Nutrição