



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL – PPGBA

ISMAELA MARIA FERREIRA DE MELO

**AVALIAÇÃO DA RETINOPATIA DIABÉTICA EM RATOS INDUZIDOS PELA
ESTREPTOZOTOCINA APÓS TRATAMENTO COM MELATONINA**

RECIFE-PE

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL-PPGBA

ISMAELA MARIA FERREIRA DE MELO

**AVALIAÇÃO DA RETINOPATIA DIABÉTICA EM RATOS INDUZIDOS PELA
ESTREPTOZOTOCINA APÓS TRATAMENTO COM MELATONINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Biociência Animal. Área de Concentração em Morfofisiologia Animal.

Orientador

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientadores

Prof^ª. Dr^a. Valeria Wanderley Teixeira

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá

RECIFE

2016

ISMAELA MARIA FERREIRA DE MELO

**AVALIAÇÃO DA RETINOPATIA DIABÉTICA EM RATOS INDUZIDOS PELA
ESTREPTOZOTOCINA APÓS TRATAMENTO COM MELATONINA**

Aprovada em de fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá-UFRPE

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho – UFPE

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares-UFRPE

AGRADECIMENTOS

Depois da tese concluída, poder agradecer as pessoas que fizeram parte desta etapa da minha vida é um dos momentos de maior satisfação e alegria que tive.

Agradeço inicialmente a Deus, por sempre estar comigo e me proporcionar proteção, perseverança e força nesses anos de luta.

Aos meus pais Ismael Melo e Maria do Amparo de Melo, que são as pessoas mais importantes da minha vida, a eles, devo tudo o que sou. Serei eternamente grata por tudo o que fizeram e fazem por mim. Amo vocês.

Aos meus irmãos Ismália Melo e Sandro Melo, pelo apoio, companheirismo e força de sempre.

Aos meus orientadores Álvaro Teixeira e Valéria Teixeira pelo acolhimento, atenção, amizade, paciência e ensinamentos. Vocês são os grandes responsáveis pelo meu crescimento profissional. Obrigada por tudo.

Ao professor Fabrício Bezerra de Sá, que abriu as portas do seu laboratório para a execução de parte desse projeto. Obrigada pelo apoio, amizade e ensinamentos. E, foi nesse laboratório que pude contar com a imensa ajuda de um grande amigo Elton Hugo, obrigada por tudo Elton, você sabe que foi peça chave na execução desse projeto.

Agradeço imensamente ao professor Leucio Duarte Vieira, por ter recebido a mim e a Cintia com tanto carinho, amizade e atenção em seu laboratório, não esquecendo de estender esses agradecimentos aos colegas Nielson, Edjair, Juliana, Regina, Alana e Linaldo que tanto nos deram apoio nesse laboratório.

Agradeço as minhas amigas que considero como irmãs Carolline Guimarães, Solange Bezerra, Welma Emídio, Aline Mariano e Hilda Santos, vocês são diamantes na minha vida, sei que nossa amizade será eterna e independentemente do caminho que a vida nos leve, vocês sempre estarão no meu coração. Adoro vocês.

Um agradecimento muito especial eu faço a minha amiga irmã Cintia Giselle, que foi meu braço direito, esquerdo, minhas pernas e meus olhos nessa jornada, ela foi uma pessoa com quem pude contar em todos os momentos e que sempre estava com o coração aberto a me ajudar. Raras são as pessoas como você, agradeço a Deus a nossa amizade. Obrigada sempre.

Agradeço aos meus amigos do laboratório de histologia Franklin Magliano, Marina Gomes, Mariana, Hilton Nobre, Clovis Lapa, Fernanda Angelo, Cristiane, Andresa, Bárbara, Lilian (inseto), Márcio, Nane, Carol (inseto), Yuri e em especial a Lecio Leone por todo apoio na parte histopatológica. A presença de vocês tornaram meus dias mais felizes.

Agradeço a José Carlos (Binho), que com muita boa vontade disponibilizava seu tempo para o transporte dos animais para a federal. Muito obrigada.

Agradeço também aos meus amigos casal 20 Vitor Caiaffo e Belisa Duarte. Vocês são nota mil.

Aos meus amigos vizinhos de laboratório, Juan Ardilles, Eva Luana, Jeine Emanuelle, Daniella Pessoa e Radamés. Vocês são pessoas muito queridas e especiais. Obrigada por tudo.

Agradeço imensamente a técnica Maria Edna por toda amizade, gentileza e suporte.

Agradeço aos bioteristas André e Renata por todo suporte que me deram com os animais e pela imensa consideração e amizade que sempre tiveram comigo. Obrigada de coração.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa e a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em especial ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) Laboratório de Histologia por todo apoio na execução desse projeto.

Enfim, agradeço a todos que direta e indiretamente contribuíram na execução deste projeto.

RESUMO

A retinopatia diabética é uma doença metabólica com comprometimento microvascular com alto risco de perda da visão. Ela ocasiona danos estruturais e funcionais na retina, aumenta a expressão de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e induz a neovascularização intraocular patológica. O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação da melatonina sobre a histopatologia, estresse oxidativo (retina e pâncreas) e atividade elétrica da retina bem como se ela seria capaz de mediar a expressão de VEGF, IL-6 e TNF- α , além do índice apoptótico. Utilizou-se 50 ratos divididos nos seguintes grupos: **GC**: ratos sem indução ao diabetes pela estreptozotocina; **GD**: ratos com diabetes induzidos pela estreptozotocina e tratados com placebo; **GDM**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e após confirmação do diabetes tratados com melatonina na dosagem de 10 mg/kg de peso corporal durante 20 dias; **GDMS**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e simultaneamente tratados com melatonina na dosagem de 10 mg/kg durante 20 dias; **GDI**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e após confirmação do diabetes tratados com insulina durante 20 dias. O diabetes foi induzido pela administração intraperitoneal de estreptozotocina (60mg/kg), a melatonina foi administrada à noite por via subcutânea, e a insulina (5U/dia) pela mesma via. Para apoptose foi realizado o método de TUNEL e para a análise imunohistoquímica foram analisados os alvos para IL-6, TNF- α e VEGF. O estresse oxidativo pancreático foi avaliado através da mensuração da peroxidação lipídica e níveis de glutathiona reduzida, enquanto o estresse na retina foi analisado pela produção de ânions superóxidos. Os resultados mostraram que a melatonina atenuou as alterações histopatológicas; diminuiu o processo inflamatório e regulou os mecanismos que ocasionaram estresse oxidativo e no eletrorretinograma interferiu na amplitude da onda a do exame da mista entre os grupos GC e GD. Concluímos assim, que esse hormônio pode ser um importante fator coadjuvante no tratamento da retinopatia diabética devido a sua propriedade antioxidante e moduladora de processos inflamatórios, amenizando as alterações decorrentes desta patologia, principalmente quando administrado simultaneamente à indução do diabetes onde foi observado uma melhora expressiva na preservação da retina no aumento da insulina plasmática e na diminuição da hiperglicemia.

Palavras chave: Retinopatia diabética, pineal, interleucinas, eletrorretinograma, imunohistoquímica, apoptose.

ABSTRACT

Diabetic retinopathy is a metabolic disease with cardiovascular involvement with high risk of vision loss. It causes structural and functional damage to the retina increases the expression of inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) and induces pathological intraocular neovascularization. The aim of this study was to evaluate the effect of melatonin on histopathology, oxidative stress (retina and pancreas) and electrical retinal activity and if she would be able to mediate the expression of VEGF, IL-6 and TNF- α , in addition to index apoptotic. We used 50 rats divided into the following groups: GC: no induction mice diabetes by streptozotocin; GD: rats with diabetes induced by streptozotocin treated and placebo; GDM: rats by streptozotocin induced diabetes mellitus and after confirmation treated with melatonin at dosage of 10 mg / kg body weight for 20 days; GDMS: mice induced by streptozotocine diabetes and simultaneously treated with melatonin at dosage of 10 mg / kg for 20 days; GDI: rats by streptozotocin induced diabetes mellitus and after confirmation treated with insulin for 20 days. Diabetes was induced by intraperitoneal administration of streptozotocin (60mg / kg), melatonin was administered subcutaneously at night, and insulin (5U / day) by the same route. For apoptosis was performed TUNEL assay and immunohistochemistry targets were analyzed for IL-6, TNF- α and VEGF. The pancreatic oxidative stress was assessed by measurement of lipid peroxidation and reduced glutathione levels while stress in the retina was analyzed for the production of superoxide anions. The results showed that melatonin attenuated histopathological changes; decreased inflammation and regulated the mechanisms that caused oxidative stress and electroretinography interfere with the amplitude of the wave of the joint examination between the GC and GD groups. It is concluded that this hormone may be an important contributing factor in the treatment of diabetic retinopathy due to its antioxidant property and modulating inflammatory processes, softening the changes of this pathology, especially when administered concurrently with diabetes induction it was observed a significant improvement retinal preservation in increased serum insulin and decreased hyperglycemia.

Keywords: Diabetic retinopathy, pineal, interleukins, electroretinography, immunohistochemistry, apoptosis.

SUMÁRIO

Capítulos	Pág.
I	
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Diabetes Mellitus.....	21
2.2 A Retina.....	24
2.3 Retinopatia diabética.....	31
2.4 Melatonina	33
2.5 Melatonina e diabetes.....	36
2.6 Melatonina e retina.....	36
2.7 Eletroretinograma.....	37
2.8 Componentes analisados no eletroretinograma.....	40
2.9 Eletroretinograma e enfermidades.....	42
2.10 Estresse oxidativo e diabetes.....	43
2.11 Citocinas inflamatórias envolvidas na retinopatia diabética....	48
3. REFERÊNCIAS.....	52
II	
Potencial terapêutico da melatonina sobre o estresse oxidativo (retina e pâncreas), histopatologia e atividade elétrica na retina em ratos com retinopatia diabética.....	70
RESUMO.....	71
INTRODUÇÃO.....	73
MATERIAIS E MÉTODOS.....	75
RESULTADOS.....	80
DISCUSSÃO.....	84
REFERÊNCIAS.....	90
III	
Melatonina regula expressão de citocinas inflamatórias, VEGF e	

apoptose em ratos com retinopatia diabética.....	111
RESUMO.....	112
INTRODUÇÃO.....	114
MATERIAIS E MÉTODOS.....	116
RESULTADOS.....	120
DISCUSSÃO.....	122
REFERÊNCIAS.....	127

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

LISTA DE ABREVIATURAS

97

98	AGEs	Produtos finais de glicação avançada
99	Ang-2	Angiopoietinas
100	BSA	Albumina sérica bovina
101	BCL-2	Proteína antiapoptose
102	CAT	Catalase
103	CV	Corpo vítreo
104	Cox-2	Ciclo-oxigenase 2
105	CIP-450	Citocromo P-450
106	Cd/m²	Candela por metro quadrado
107	DM	Diabetes mellitus
108	DAB	Diaminobenzidina
109	ERG	Eletrorretinograma
110	EPR	Epitélio pigmentar da retina
111	EO	Estresse oxidativo
112	Fas	Receptor de morte da família TNF
113	GC	Grupo controle
114	GD	Grupo diabético
115	GDM	Grupo diabético tratado com melatonina
116	GDMS	Grupo diabético tratado com melatonina simultaneamente
117	GDI	Grupo diabético tratado com insulina
118	GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
119	GLUTs	Proteínas transportadoras de glicose
120	Gp 130	Glicoproteína 130
121	GSH	Glutathione reduzida
122	GSS	Glutathione sintetase
123	GPx	Glutathione peroxidase
124	GPXs	Glutathione peroxidases
125	GST	Enzima glutathione S-transferase
126	Hz	Hertz

127	IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
128	IL-6	Interleucina 6
129	IL-1	Interleucina 1
130	ISCEV	Sociedade internacional de eletrofisiologia clínica da visão
131	JNK/SAPK	Proteínas quinase ativadas por estresse jun-quinase amino-terminal
132	LDL	Lipoproteína de baixa densidade
133	LED	Diodo emissor de luz
134	MV	Micro volts
135	MT1	Receptor de melatonina 1
136	MT2	Receptor de melatonina 2
137	μ	Micrômetro
138	mM	Micromolar
139	μM	Micromol
140	M	Molar
141	mcd/m²	Milicandela por metro quadrado
142	ms	Milisegundos
143	mg/dL	Miligramas por decilitro
144	mg/kg	Miligramas por quilo
145	MAP	Proteína quinase ativada por mitógeno
146	NSQ	Núcleo supraquiasmático
147	NF-KB	Fator nuclear KB
148	NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
149	NO	Óxido nítrico
150	OMS	Organização mundial de saúde
151	PKC	Proteína quinase C
152	PLGF	Fator de crescimento placentário
153	PBS	Tampão fosfato salino
154	PO	Potencial oscilatório
155	PARY	Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma
156	RD	Retinopatia diabética
157	RDP	Retinopatia diabética proliferativa
158	ROS	Espécies reativas ao oxigênio
159	ROO	Radical peroxil

160	RNS	Espécies reativas ao nitrogênio
161	RGB	Red-green-blue (vermelhor-verde-azul)
162	SOD	Superóxido dismutase
163	TNF-α	Fator de necrose tumoral
164	TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
165	TNFR1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
166	TNFR2	Receptor 2 do fator de necrose tumoral
167	TdT	Desoxinucleotídeo terminal transferase
168	U/dia	Unidades por dia
169	VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
170	VEGFR-1	Receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular
171	VEGFR-2	Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular
172	γ-CGS	Gama glutamilcisteína

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

LISTA DE FIGURAS

193

194

195 **Figura 1.** Diagrama de organização das células da retina. Fonte: bioug.blogspot.com....26

196 **Figura 2.** Padrão vascular da retina. Injeção de fluoresceína. A partir do disco óptico
197 a artéria central da retina ramifica-se em várias arteríolas retinianas que se
198 distribuem radialmente até à periferia. As vénulas retinianas surgem num plano mais
199 profundo e convergem no disco óptico. DO, disco óptico; A, arteríolas; V, vénula.

200 Fonte: Dissertação de mestrado Joana Araújo Nobre Catita.....31

201 **Figura 3.** Esquema das ondas a e b do eletrorretinograma.....41

202 **Figura 4.** Níveis plasmáticos do hormônio insulina (mg/dL). GC- grupo controle; GD-
203 grupo diabético; GDM – grupo diabético tratado com melatonina; GDMS – grupo
204 diabético tratado com melatonina simultânea; GDI – grupo diabético tratado com
205 insulina. **A-** grupos experimentais antes da indução; **B-** grupos experimentais com 10
206 dias das administrações; **C-** grupos experimentais com 20 dias das administrações.

207 *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo
208 teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).....100

209 **Figura 5.** Gráfico dos valores de GSH no pâncreas dos animais nos diferentes
210 grupos experimentais (nmol/mg de proteína). GC- grupo controle; GD- grupo
211 diabético; GDM – grupo diabético tratado com melatonina; GDMS – grupo diabético
212 tratado com melatonina simultânea; GDI – grupo diabético tratado com insulina.

213 *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo
214 teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).....101

215 **Figura 6.** Gráfico dos valores de TBARS no pâncreas dos animais nos diferentes
216 grupos experimentais (nmol/mg de proteína). GC- grupo controle; GD- grupo
217 diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina
218 simultânea; GDI – grupo diabético insulina. *Médias seguidas pela mesma letra não

219 diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn
220 ($p < 0,05$).....102

221 **Figura 7.** Gráfico dos valores de Superóxido basal (A) e Atividade da NADPH
222 oxidase na retina dos animais nos diferentes grupos experimentais (RLU/mg de
223 proteína). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético tratado
224 com melatonina; GDMS – grupo diabético tratado com melatonina simultaneamente;

225 GDI – grupo diabético tratado com insulina. *Médias seguidas pela mesma letra não
226 diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn
227 ($p < 0,05$).....103

228 **Figura 8.** Nas fotomicrografias são demonstradas as camadas da retina, tomando
229 como referência inicial a porção interna do lado esquerda, adjacente ao corpo vítreo
230 (CV). Assim, a análise histopatológica de amostras de retina de ratos do grupo
231 controle (Fig. A) revelou a presença de estruturas bem preservadas como a
232 membrana limitante interna (cabeça de seta), camada de células ganglionares (g),
233 células amácrinas (setas curtas), camada plexiforme interna (pi), camada plexiforme
234 externa (pe), camada nuclear interna (ni), camada de bastonetes e cones (bc),
235 epitélio pigmentar (setas tracejadas) e coróide (c). Após exposição à
236 estreptozotocina (Fig. B) observou-se desorganização da camada nuclear externa
237 (ne) com presença de inúmeros vacúolos (setas longas), camada plexiforme externa
238 pouco visível, deslocamento seroso da retina (dupla seta) e vasos sanguíneos
239 dilatados (asterisco) quadro típico de retinopatia diabética. Porém, após o tratamento
240 com insulina (Fig. C) e melatonina (Fig. D) observou-se menor progressão da
241 retinopatia diabética. Verificou-se, ainda, que no grupo tratado com melatonina
242 simultaneamente (Fig. E) houve melhor preservação da retina.....104

243 **Figura 9.** Fotomicrografia dos vasos da retina dos grupos experimentais. Observar
244 uniformização do padrão vascular entre os grupos experimentais. Figura A e B
245 (grupo controle), Figura C (grupo diabético), Figura D (grupo diabético tratado com
246 melatonina) e Figura E (grupo diabético tratado com melatonina simultaneamente) e
247 Figura F (grupo diabético tratado com insulina).....105

248 **Figura 10.** Fotomicrografia dos vasos da retina dos grupos experimentais. Observar
249 presença de microaneurismas (seta preta) e tortuosidades (seta com cabeça branca)
250 nos vasos da retina do grupo diabético Figura B e do grupo insulina Figura E.
251 Observar atenuação desses fatores no grupo tratado com melatonina Figura C e no
252 grupo tratado com melatonina simultânea Figura D.....106

253 **Figura 11.** Eletrorretinograma escotópico entre os grupos experimentais. Não foi
254 observada diferença estatística entre eles. **A-** formato da onda adquirido no

255	eletrorretinograma. B- gráfico mostrando amplitude em μV $p < 0,05$ e tempo implícito	
256	em ms $p < 0,05$ entre os grupos.....	107
257	Figura 12. Eletrorretinograma fotópico entre os grupos experimentais. A- formato	
258	das ondas adquiridas pelo eletrorretinograma dos grupos. Não foi observada	
259	diferença estatística entre eles. B- gráfico mostrando amplitude em μV $p < 0,05$ e	
260	tempo implícito em ms $p < 0,05$ entre os grupos.....	108
261	Figura 13. Eletrorretinograma escotópico misto dos grupos experimentais. A-	
262	formato da onda adquirido no eletrorretinograma. Foi observada diferença estatística	
263	na amplitude da onda <i>a</i> entre o GC e o GD. B- gráfico mostrando amplitude em μV	
264	$p < 0,05$ e tempo implícito em ms $p < 0,05$ entre os grupos.....	109
265	Figura 14. Eletrorretinograma flicker dos animais dos grupos experimentais. A-	
266	formato das ondas adquiridas pelo eletrorretinograma dos grupos. B – Tempo	
267	Implícito do Flicker, em ms.– Amplitude do Flicker, em μV . * $p < 0,05$	110
268	Figura 15. Níveis plasmáticos do hormônio insulina (mg/dL). GC- grupo controle;	
269	GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético tratado com melatonina; GDMS – grupo	
270	diabético tratado com melatonina simultânea; GDI – grupo diabético tratado com	
271	insulina. A- grupos experimentais antes da indução; B- grupos experimentais com 10	
272	dias das administrações; C- grupos experimentais com 20 dias das administrações.	
273	*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo	
274	teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).....	137
275	Figura 16. Imunohistoquímica e quantificação do IL6 na retina. Observar em A (GC),	
276	C (GDM) e D (GDMS) fraca marcação, em B (GD) forte marcação nas camadas	
277	ganglionares (seta longa), nuclear interna (cabeça da seta) e nuclear externa (seta	
278	curta), enquanto que em E (GDI) nota-se moderada marcação apenas na camada	
279	nuclear externa (seta branca). F – Quantificação em pixels da expressão do fator	
280	IL6. Notar redução significativa dos pixels entre os grupos GD e GDI, e em relação	
281	aos demais grupos experimentais. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem	
282	significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)....	138
283	Figura 17. Imunohistoquímica e quantificação do $\text{TNF}\alpha$ na retina. Observar em A	
284	(GC), C (GDM) e D (GDMS) fraca marcação, em B (GD) e E (GDI) moderada	

285 marcação apenas na camada nuclear externa (seta). F – Quantificação em pixels da
 286 expressão do fator TNF α . Notar redução significativa dos pixels nos grupos GD e
 287 GDI em relação aos demais grupos experimentais. *Médias seguidas pela mesma
 288 letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-
 289 hoc Dunn ($p<0,05$).....139

290 **Figura 18.** Imunohistoquímica e quantificação do VEGF-A na retina. Observar em A
 291 (GC), C (GDM) e D (GDMS) fraca marcação, em B (GD) e E (GDI) moderada
 292 marcação nas camadas nuclear interna (seta fina) e externa (seta grossa). F –
 293 Quantificação em pixels da expressão do fator VEGF-A. Notar redução significativa
 294 dos pixels entre os grupos GD e GDI, e em relação aos outros grupos experimentais.
 295 *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo
 296 teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p<0,05$).....140

297 **Figura 19.** Índice apoptótico na retina. Observar redução significativa nos grupos
 298 GDM e GDMS em relação ao grupo GD. *Médias seguidas pela mesma letra não
 299 diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn
 300 ($p<0,05$).....141

301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio crônico, caracterizado por alteração no metabolismo da glicose e outras substâncias produtoras de energia, resultando tardiamente em complicações vasculares e neuropáticas, ou seja, é um grupo de distúrbios metabólicos caracterizados por hiperglicemia resultante de disfunções na secreção de insulina ou da perda progressiva de sua ação, ou ambos os fatores (SHERWIN, 2000; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008). A incidência do diabetes varia na população mundial e Segundo a Federação Internacional de Diabetes, a epidemia da doença continua a aumentar no mundo, com a impressionante marca de 300 milhões de pessoas afetadas. Além disso, estima-se que até 2030, 500 milhões de pessoas sejam afetadas (WHITING et al., 2011) e que ele é a principal causa de cegueira nos países industrializados entre as populações economicamente ativas, correspondendo a 30% dos pacientes com perda de acuidade visual (BOTASSIO; YAMASATO; MEDEIROS, 2015).

Nesta enfermidade, a principal alteração ocular ocorre na retina, cerca de 40% dos diabéticos têm algum grau de retinopatia que depende dos anos de duração e do controle inadequado da doença (MEDINA; MUÑOZ, 2011). A retinopatia diabética (RD) é caracterizada por um conjunto de alterações vasculares da retina que acomete quase todos os pacientes com diabetes mellitus e, é considerada a principal causa de cegueira em adultos na idade produtiva, (BARBER, 2003; KOLLIAS, ULBIG, 2010; MEDINA; MUÑOZ, 2011).

Existem duas fases da retinopatia diabética: a não proliferativa, que refere-se à fase inicial da doença e a proliferativa, que é a fase avançada, onde ocorre manifestações como hemorragias, proliferação fibrovascular e deslocamento tracional da retina, neovasos na íris e glaucucoma (BOELTER et al., 2003). A fase não proliferativa se subdivide em leve, moderada e grave e a proliferativa em de

baixo risco, de alto risco e com doença ocular diabética avançada, associada ou não ao edema de mácula (WILKINSON et al., 2003).

Sabe-se que no diabetes, os níveis de citocinas pró-inflamatórias são aumentadas (KOWLURU; ODENBACH., 2004) e que a regulação positiva de vários fatores, tanto angiogênicos quanto inflamatórios, tem sido relacionados com a patogênese da retinopatia diabética (AIELLO., 2005). Entre elas podemos citar o VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular) que atua sob condições de hipóxia ou isquemia estimulando o aumento da vasculatura, as interleucinas e o fator de necrose tumoral (TNF- α) os quais têm sido relacionados com as vias fisiopatológicas que conduzem a RD (RANGASAMY; McGUIRE; DAS, 2012).

Além desses fatores, a causa de maior estado inflamatório na RD pode está relacionado ao aumento dos danos oxidativos via desordens nas cadeias de transporte de elétrons, com consequente superprodução de radicais livres, lipoperóxidos e redução das defesas antioxidantes (LOPES; OLIVEIRA; FORTUNATO, 2008). Estudos *in vivo* revelaram que o estresse oxidativo, secundário à hiperglicemia ocorre antes das complicações mais tardias do diabetes se manifestarem clinicamente, sugerindo que o estresse oxidativo desempenha um papel particularmente relevante na patogênese dessa doença (HAMILTON; CHEW; WATTS, 2007).

Um dos problemas no tratamento da retinopatia diabética é que normalmente as alterações oculares são assintomáticas e quando o paciente chega aos serviços especializados pode ser tarde para o tratamento e preservação da visão (MEDINA; MUÑOZ, 2011).

Foi proposto que tratamentos com antioxidantes podem ser uma importante opção terapêutica na prevenção das complicações vasculares causadas pelo diabetes (BONJUGA et al., 2004). A melatonina (N-acetil 5 metoxitriptamina) hormônio produzido pela glândula pineal, é um dos mais poderosos antioxidantes naturais (REITER et al., 1999), conhecido como hormônio marcador do escuro (SOUSA; CRUZ-MACHADO; TAMURA, 2008). Esta indolamina derivada do triptofano foi descrita por Lerner et al., (1958), e está presente na maioria das espécies, inclusive organismos unicelulares (MARKUS; JUNIOR; FERREIRA, 2003). Sabe-se atualmente que a melatonina é um hormônio que possui diferentes funções atuando como um agente endócrino e/ou parácrino (STEFULJ et al., 2001). Como

função mais abrangente atua como um transdutor fotobiológico, preparando o organismo para responder às condições de escuro (SOUSA; CRUZ-MACHADO; TAMURA, 2008). Desta forma, a pineal confere ritmos a uma série de funções neuroendócrinas que modula, determinando, por exemplo, o ciclo sono-vigília, a atividade reprodutora e a atividade metabólica de várias espécies (MAGANHIN et al., 2008).

Mehmet et al., (2008) mostraram que a melatonina na dosagem de 10 mg/kg/dia administrada durante oito semanas reduziu danos na córnea de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina, além disso, em um trabalho com um modelo de isquemia induzida, a melatonina bloqueou a apoptose em células do epitélio pigmentar do olho mantidas em cultura (OSBORNE; NASH; WOOD, 1998). De acordo com Ozguner; Bardak; Comlekci (2006) o tratamento com 100µg Kg⁻¹ em ratos submetidos à radiação eletromagnética reduziu o estresse oxidativo na retina.

O controle metabólico do diabetes mellitus é um importante fator na progressão e gravidade da retinopatia diabética, sendo que pacientes tratados de forma intensiva (objetivando glicose sanguínea e hemoglobina glicosilada o mais próximo do normal), tem reduzido o risco de complicações microvasculares havendo, portanto, grande associação entre o grau do controle metabólico e o desenvolvimento desta enfermidade (LOVESTAM-ADRIAN; AGARDH; TORFFVIT, 1999; THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATION TRIAL, 2000).

Distintos trabalhos demonstraram que a melatonina tem um papel no gasto energético, no ritmo circadiano da glicemia, na regulação da massa corporal e sobre a secreção e ação da insulina periférica (LIMA et al., 1998; LA FLEUR et al., 2001; PICINATO et al., 2002). A relação entre a melatonina, pâncreas endócrino, e regulação do metabolismo energético têm sido sugeridas tanto em humanos quanto em ratos (LA FLEUR et al., 1999; PESCHKE et al., 2007). Este hormônio possui efeitos modulatórios positivos sobre a secreção e ação da insulina (PESCHKE et al., 2007).

Ela previne danos oxidativos à macromoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (REITER et al., 2001). Além disso, ela estimula a expressão de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e glutathione peroxidase (BAYDAS et al., 2001). No diabetes melitus o aumento do estresse oxidativo, devido ao aumento na geração de espécies reativas ao oxigênio, combinado com a

diminuição da proteção antioxidante da melatonina pode, possivelmente ter um papel na retinopatia diabética (OBROSOVA; FATHALLAH; GREENE, 2000).

Sabendo-se que a hiperglicemia decorrente do diabetes é um dos principais fatores que contribui para o desenvolvimento da retinopatia diabética e que a melatonina modula as funções da retina (LUVONE et al., 2005; WIECHMANN; SUMMERS, 2008), além ser um dos maiores antioxidantes naturais, a presente pesquisa propõe testar a hipótese de que a melatonina exógena pode neutralizar os efeitos adversos da retinopatia diabética.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diabetes mellitus

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico crônico, caracterizado por níveis elevados na concentração de glicose circulante, em função da deficiência na secreção (Diabetes mellitus tipo 1), ou, no comprometimento da ação periférica da insulina (resistência à insulina), o que caracteriza o diabetes mellitus tipo 2 (SILVA et al., 2011). Cerca de 350 milhões de pessoas no mundo são estimadas ter diabetes (DANAIE et al., 2011) com o tipo 2 respondendo a cerca de 90% de todos os casos diagnosticados (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008), representando assim, um grande problema na saúde pública (LUO; MEI-LING, 2014).

O diabetes é um dos principais fatores responsáveis pelas doenças crônicas coronarianas e insuficiência cardíaca no mundo ocidental (GO et al., 2013). Assim, consequências para os organismos são variadas, incluindo hipertensão, nefropatias, retinopatias, cardiopatias e neuropatias e quando a reabsorção renal de glicose ultrapassa o seu limiar, ocorre a glicosúria, causando uma diurese osmótica que leva à poliúria e a polidipsia (SILVA et al., 2011). A hipertensão coexistente, leva à lesão renal progressiva, portanto o seu tratamento diminui a evolução da nefropatia diabética (RANG et al., 2004).

Os Estados Unidos é um dos principais países afetados com essa doença apresentando 28 milhões de pessoas comprometidas e com uma incidência anual de 180 mil novos casos (GO et al., 2013). O risco de doenças cardiovasculares é também bastante elevado em pacientes com diabetes, representando a causa primária de sua morbidade e mortalidade (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). Especificamente, indivíduos com diabetes apresentam uma disfunção na regulação do fluxo sanguíneo nas artérias coronárias (BAGI; FEHER; BELEZNAI, 2009).

A prevalência no Brasil é comparável à dos países mais desenvolvidos onde o DM é considerado o maior problema de saúde. Entretanto, é na sua morbidade que se encontra o maior impacto sócioeconômico (BOSCO et al., 2005). Esse impacto, deve-se as complicações causadas pelo diabetes que encurta a vida produtiva dos

indivíduos, piorando sua qualidade de vida e a dos seus familiares. Estimativas indicam que em alguns países, essa doença pode comprometer de 5% a 14% das despesas destinadas à saúde (BOSCO et al., 2005).

A hiperglicemia nessa enfermidade ocorre devido ao débito hepático alterado de glicose, e, à captação diminuída de glicose pelos músculos esqueléticos com síntese reduzida de glicogênio (SILVA et al., 2011) além disso, ela ocasiona alterações no metabolismo dos lipídeos e proteínas (DAS; PADAYUTTI; PAULOSE, 1996). Bem como, a insulina é o hormônio anabólico que após interação com seu receptor de membrana específico, estimula a captação de glicose pelas células por meio de proteínas integrais de membrana denominadas GLUTs (MOURA et al., 2012). Tal evento regula a homeostase glicêmica, estimula a lipogênese hepática, e nos adipócitos reduz a lipólise, bem como regula o “turnover protéico” (SABETSKY; EKBLOM, 2010).

O diabetes mellitus pode ser classificado em: DM tipo 1, DM tipo 2, Diabetes gestacional e outros tipos específicos de diabetes (YAMAZAKI, 2004). No diabetes tipo 1, também conhecida como “juvenil”, ocorre devido a destruição das células β por um processo autoimune (tipo A), o que envolveria a complexa cooperação entre o sistema imune inato e o adaptativo, evolutivamente projetados para fornecer proteção contra ameaças ambientais (MANDRUP-POULSEN, 2014), ou por uma causa desconhecida (tipo B ou idiopática). Na forma autoimune, ocorre um processo de insulite e a presença de autoanticorpos (anti-descarboxilase de ácido glutâmico, anti-ilhotas e anti-insulina) (GROSS et al., 2002). Enquanto da idiopática, caracteriza-se pela ausência de insulite e de autoanticorpos. A ausência absoluta de insulina no DM tipo 1, resulta em manifestações clínicas evidentes quando comparadas à do tipo 2 (GROSS et al., 2002).

Todavia, o DM tipo 2, é ocasionada devido a distúrbios na secreção e ação da insulina (YAMAZAKI, 2004). Anteriormente era mais frequente em indivíduos acima de 40 anos, sendo denominada diabetes da maturidade, hoje, no entanto, ocorre uma alta incidência em indivíduos jovens (YAMAZAKI, 2004). O tipo 2 é uma doença multifatorial, sendo o resultado de uma combinação de genes e de fatores ambientais (KAHN, 1994), contudo, devido a quantidades significativas de insulina residual, hiperglicemia, cetoacidose no organismo, não sejam tão evidentes, torna difícil o diagnóstico precoce da doença (YAMAZAKI, 2004). Por isso, ela ocasiona

complicações à nível microvascular (retinopatias, nefropatias) e macrovascular (doenças coronárias, doenças vasculares periféricas) e neuropatias, afetando nervos motores, sensoriais e autonômicos (SIMA; SUGIMOTO, 1999).

No DM gestacional, ocorre tolerância diminuída aos carboidratos podendo persistir ou não após o parto para o DM tipo 2 (BUCHANAN et al., 2007; GROSS et al., 2002). Entretanto, em outros tipos específicos de diabetes, eles são ocasionados devido a defeitos genéticos na função das células β e na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, indução por drogas ou produtos químicos, infecções e formas incomuns de diabetes imuno-mediado (GROSS et al., 2002).

Hiperglicemia crônica no diabetes leva a complicações microvasculares que afetam severamente a qualidade de vida (SALIDO et al., 2013). A retinopatia diabética pode ser a mais comum dessas complicações e uma das principais causas de deficiência visual e cegueira (SALIDO et al., 2013). Em pacientes, sem controle adequado do DM tipo 1 ou tipo 2, a microcirculação retiniana é constantemente exposta à níveis elevados de glicose, e este fato resulta em muitas alterações estruturais e funcionais (UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP, 1998).

Devido à importância do diabetes, vários grupos de estudos, têm pesquisado se as complicações desta enfermidade podem ser evitadas, reduzidas, ou mesmo revertidas por meio do controle adequado dos níveis de glicose no sangue, uso de insulina exógena, ou hipoglicemiante oral (ZANGON et al., 2006). Dietas e exercícios físicos são úteis para melhorar a glicemia, sem, no entanto, restaurar completamente a ação da insulina (ALZAID, 1996).

Entre os fármacos utilizados até o momento se encontram: as sulfonilúreas, que agem nas células β pancreáticas aumentando a secreção de insulina e que apresentam como alvo molecular o receptor de sulfonilúrea; as tiazolidinedionas, as quais atuam aumentando a sensibilidade dos tecidos à insulina tendo como alvo molecular o receptor gama ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR γ); a metformina, que inibi a liberação de glicose hepática e aumenta a sensibilidade periférica à insulina, nela não se tem alvo molecular conhecido e a α -glicosidase (acarbose), as quais atuam no intestino, reduzindo a taxa de absorção de carboidratos, e como alvo a α glicosidase (MOLLER, 2001; BAYLEI, 2000).

Descoberta em 1921, a insulina é utilizada em terapias no caso de câncer, queimaduras, injúrias severas, além do diabetes (MARTINEZ-RIQUELME; ALLISON, 2003). Ela apresenta ação no fígado, músculo e tecido adiposo via ativação do receptor insulina. Utilizada em todos os caso do DM tipo 1 e, em alguns casos (30%), em indivíduos com DM tipo 2. Ela promove a síntese e armazenamento de carboidratos, lipídios proteínas, além de inibir a quebra e liberação dos mesmos para a corrente sanguínea (SALTIEL; KAHN, 2001).

Hiperglicemia crônica no diabetes leva a complicações microvasculares que afetam severamente a qualidade de vida (SALIDO et al., 2013). A retinopatia diabética pode ser a mais comum dessas complicações e uma das principais causas de deficiência visual e cegueira (SALIDO et al., 2013). Em pacientes, sem controle adequado do DM tipo 1 ou tipo 2, a microcirculação retiniana é constantemente exposta à níveis elevados de glicose, e este fato resulta em muitas alterações estruturais e funcionais (UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP, 1998).

Não há dúvida de que um tratamento com insulina de forma adequada é absolutamente necessário para se obter bons resultados no tratamento do diabetes, no entanto, uma metodologia detalhada e bem fundamentada é necessária (PINHEIRO et al., 2011), visto que todas as abordagens terapêuticas ainda não são capazes de evitar as alterações do diabetes induzidas nos tecidos.

2.2. A retina

2.2.1. Estrutura

A retina é responsável pelo fenômeno chamado fototransdução, que é a transformação do estímulo luminoso em energia elétrica, ou seja, ela capta os fótons, converte a energia fotoquímica em energia elétrica, integra os potenciais de ação resultantes e transmite para o lobo occipital do cérebro, local que ocorre a decifração e interpretação das imagens (SERRARBASSA; DIAS; VIEIRA, 2008). A retina é separada da circulação sistêmica pelas barreiras hemato-retinianas e hemato-aquosa e recebe seus suprimentos nutricionais das circulações retiniana e coroidal, e possivelmente do corpo ciliar por difusão através do vítreo (BITO; SALVADOR; PETRINOVIC, 1978).

551 Ela é uma estrutura capaz de captar fótons, consome cerca de 50% de
552 oxigênio a mais que os outros tecidos, oxigênio o qual é consumido
553 consideravelmente pelos seus fotorreceptores, sendo o plexo vascular, formado pela
554 circulação da coroide, estrutura a qual fornece oxigênio e nutrientes para o epitélio
555 pigmentar da retina (GUIMARÃES; GERENUTTI, 2013).

556 Sob a luz da microscopia óptica, ela é formada por dez camadas: a primeira
557 camada, mais externa, é denominada de epitélio pigmentar que fica entre a coroide
558 e a retina; a segunda corresponde a camada de fotorreceptores, responsáveis pela
559 captação e transdução da energia luminosa; a terceira é a camada limitante externa,
560 formada pelos prolongamentos das células de Müller (células da glia); a quarta é a
561 camada nuclear externa, onde se localizam os núcleos dos fotorreceptores; camada
562 plexiforme externa, local de contato sináptico entre os fotorreceptores, células
563 bipolares e células horizontais; a sexta corresponde à camada nuclear interna, onde
564 se encontram os corpos celulares das células bipolares, amácrinas, horizontais e de
565 Müller; a sétima camada é a plexiforme interna, na qual ocorrem sinapses entre as
566 células bipolares, amácrinas e ganglionares; a oitava refere-se à camada das células
567 ganglionares, constituídas pelos núcleos das células ganglionares; a nona camada é
568 a Camada de fibras nervosas, formadas pelos axônios das células ganglionares que
569 formam o nervo óptico; e por último a décima camada é a membrana limitante
570 interna, formada pelos prolongamentos das células de Müller (GU et al., 2007).

571

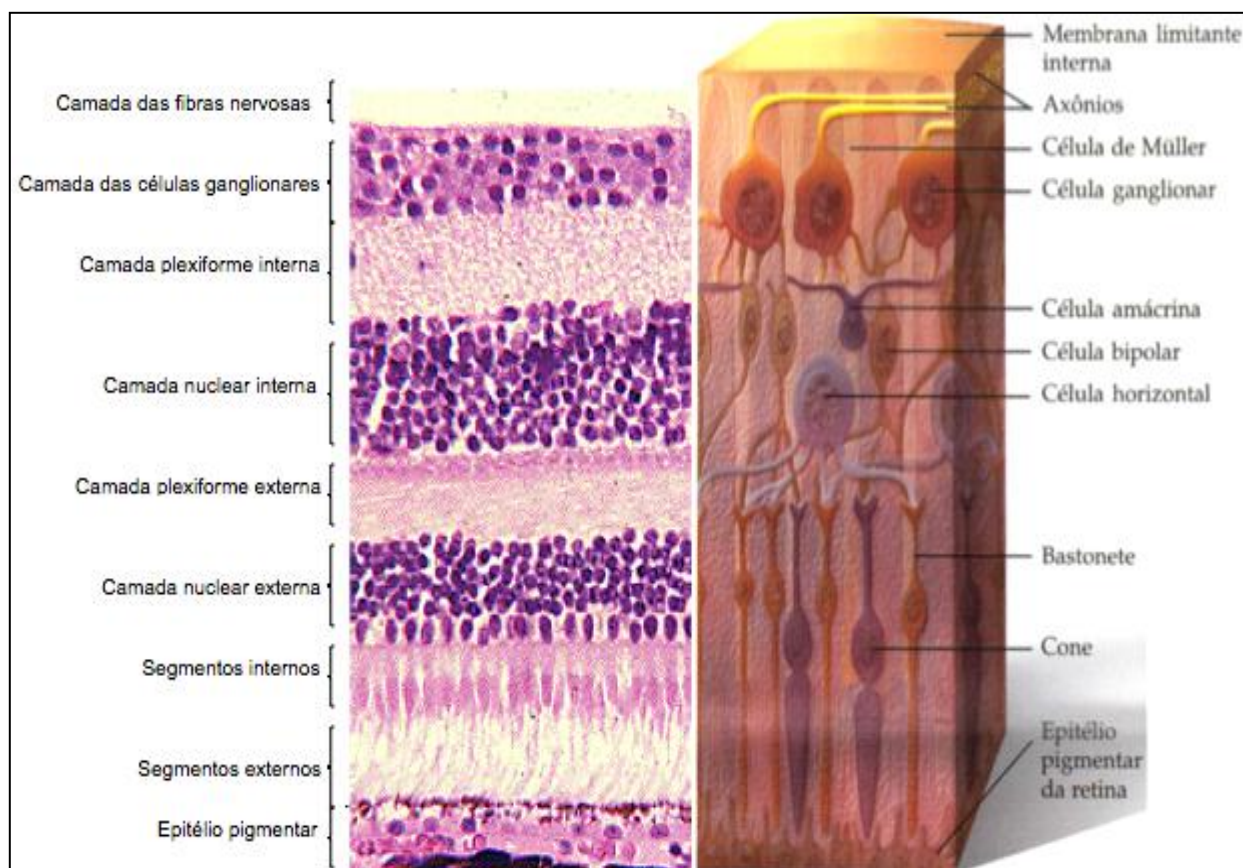


Figura 1: Diagrama de organização das células da retina. Fonte: bioug.blogspot.com

A camada de células fotorreceptoras é formada pelos cones e bastonetes, essas células estão próximas à superfície externa da retina, e a luz, para atingi-las, deve atravessar toda a cavidade vítrea e a parte interna da retina (BOSCO et al., 2005). A camada mais externa é o epitélio pigmentado, o qual está em íntimo contato com os segmentos externos dos fotorreceptores (CORMACK, 1996).

Os neurônios (fotorreceptores, células bipolares, horizontais, amácrinas e ganglionares) desempenham funções sensoriais e definem a percepção da cor, resolução espacial e discriminação de contraste (MASLAND, 2001). Todavia, as células de Müller e os astrócitos são células gliais que estão presentes desde o epitélio pigmentado da retina até a membrana limitante interna, sendo responsáveis pelo fornecimento de suporte nutricional e regulatório para os neurônios (SERRARBASSA; DIAS; VIEIRA, 2008). Além disso, convertem substratos, incluindo lactato e aminoácidos, da circulação para os neurônios, regulam as propriedades das barreiras hemato-retinianas (GARDNER et al., 1997) e a função sináptica (NEWMAN, 2003). As células de Müller, regulam a concentração de íons extracelular

para modular a polarização e a despolarização da membrana plasmática, participam com os fotorreceptores do ciclo glutamato-glutamina para controlar a neurotransmissão, armazenam glicogênio para conversão em lactato e protegem os neurônios da excitotoxicidade do glutamato (LIETH, 2001). As células gliais estão presentes entre os neurônios e os vasos da retina e fazem parte do seu metabolismo e nutrição (ANTONETTI et al., 2006).

Outro tipo de célula presente na retina é a micróglia, que são macrófagos controladores do ambiente local pela interação com neurônios e células da glia, elas reagem aos estresses causados por traumas, infecções ou deslocamento da retina, devido a liberação de enzimas pró-inflamatórias (KRADY et al., 2005). Em relação ao suporte nutricional e a remoção de produtos indesejáveis enviados para dentro da retina, os pericitos e as células vasculares endoteliais são os responsáveis, e tem sido foco de muita pesquisa em retinopatia diabética (SERRARBASSA; DIAS; VIEIRA, 2008).

A camada de células do epitélio pigmentado é formada por um epitélio cubóide simples, com células carregadas de pigmento. Ela serve como um condutor seletivo de substrato; permite a difusão de oxigênio da coróide para a retina, remove o ácido láctico da retina e fagocita o segmento externo dos fotorreceptores, além disso, faz parte da barreira hemato-retiniana externa, absorve luz, secreta fatores tróficos e, em conjunto com os fotorreceptores, participa do ciclo da vitamina A (STRAUSS, 2005).

A camada de cones e bastonetes, são células polarizadas cujas porções apicais (segmento externo), são dendritos especializados recobertos pelas células epiteliais pigmentares. As bases dos bastonetes e cones fazem sinapses com as células subjacentes da camada bipolar (GARTNER, HIATT; 1997).

Os bastonetes são ativados apenas na penumbra e são bastante sensíveis à luz, no entanto, não conseguem medir sinais em luz brilhante nem perceber as cores. São células alongadas, formadas por segmentos internos e externos, uma região nuclear e uma região sináptica. O segmento externo é constituído por várias lamelas membranosas em forma de disco que contêm rodopsina, um pigmento visual sensível à luz (GARTNER, HIATT; 1997).

Entretanto, os cones são células ativadas na luz clara e produzem maior acuidade visual do que os bastonetes. Apresentam estrutura alongada semelhantes

aos bastonetes com poucas exceções entre eles é que seu segmento externo assemelha-se mais a um cone e, ao contrário dos bastonetes, são sensíveis à cor e a luz clara. Os cones também apresentam uma diferente variedade do fotopigmento iodopsina, com cada variedade possuindo uma sensibilidade máxima ao vermelho, verde ou azul (GARTNER; HIATT, 1997).

Uma outra camada da retina é a membrana limitante externa, sendo esta formada por uma fileira de zônulas de adesão entre as células de Müller e os fotorreceptores. Contudo, a camada nuclear externa, consiste em uma zona preenchida principalmente pelos núcleos dos bastonetes e cones e a plexiforme externa é a responsável pelas sinapses axodendríticas entre as células fotorreceptoras e outras células neuronais entre elas as horizontais, as amácrinas e bipolares (GARTNER; HIATT, 1997).

A membrana limitante interna é a primeira camada interna da retina, sendo composta pelas lâminas basais das células de Müller (GARTNER, HIATT; 1997), com uma espessura média de um a três micrômetros em pacientes não diabéticos (BRASIL; BRASIL, 2006).

A camada nuclear interna é formada pelos núcleos das células de Müller, horizontais, amácrinas e bipolares e a camada plexiforme interna pelos prolongamentos das células ganglionares, bipolares e amácrinas. Por conseguinte, a camada de camada de células ganglionares, é constituída de neurônios multipolares das células ganglionares com até 30 μ de diâmetro (GARTNER, HIATT; 1997). Elas são as últimas células da retina a receber e processar a informação luminosa captada pelos fotorreceptores, compondo uma via retino-hipotalâmica que informa aos núcleos supraquiasmático a alternância de claro-escuro, participando do ciclo circadiano (ROLLAG; BERSON; PROVENCIO, 2003).

2.2.2. Fototransdução

O processamento de informação luminosa no sistema nervoso central se inicia quando a luz atravessa toda a retina e estimula o segmento externo dos fotorreceptores, apesar de suas diferenças estruturais e funcionais, os fotorreceptores desempenham mecanismos semelhantes de conversão da informação luminosa em alterações nos seus potenciais de membrana, ou seja, em

656 sinais neurais. Essa cascata de reações bioquímicas intracelulares ativadas pela luz
657 é chamada de fototransdução (JOSELEVITCH, 2008).

658 A fototransdução consiste em um processo metabólico acoplado a uma
659 proteína G. Na escuridão, os segmentos externos dos bastonetes encontram-se em
660 um estado de despolarização, devido a um influxo constante de íons sódio para o
661 seu interior. Sendo estes canais ativados por Guanosina Monofosfato Cíclico
662 (GMPc), um segundo mensageiro produzido pela enzima Guanilato ciclase, que
663 mantém os canais abertos, permitindo a entrada de sódio. Com a incidência da luz,
664 a radiação eletromagnética é absorvida pela opsina, a qual será ativada por uma
665 alteração na conformação do retinal (BURNS et al., 2002; LAMB, PUGH JR, 2006).

666 A ativação da rodopsina estimula a Transducina, proteína G localizada na
667 membrana, a qual ativa a fosfodiesterase, uma enzima efetora que hidrolisa o
668 GMPc, reduzindo sua concentração na membrana, o que determinará o fechamento
669 dos canais iônicos e a interrupção da entrada de íons sódio, hiperpolarizando a
670 membrana do segmento externo dos bastonetes (BURNS et al., 2002; LAMB; PUGH
671 JR, 2006).

672 Os fotorreceptores respondem com variações de potencial graduado,
673 sofrendo hiperpolarização, com inibição da liberação do neurotransmissor glutamato
674 com a presença de luz e despolarização estimulação da liberação de glutamato na
675 ausência do estímulo luminoso (LAMB; PUGH JR, 2006).

676 As alterações no potencial graduado nos fotorreceptores levam a alterações
677 de potencial graduado nas células bipolares, as quais são classificadas de acordo
678 com a resposta do neurotransmissor liberado. Com isto, as células bipolares podem
679 ser do tipo on, as quais se hiperpolarizam com a presença do glutamato e,
680 despolarizam na sua ausência, ou do tipo off, que possuem efeito contrário
681 (BERNTSON; TAYLOR, 2000). A função das células bipolares está diretamente
682 relacionada ao conceito de campo receptivo, que corresponde a área da retina que
683 quando estimulada, gera alterações no potencial da membrana celular (SANES;
684 ZIPURSKY; 2010). Contudo, com a chegada da luz à retina, os receptores que
685 formam o centro do campo receptivo irão se hiperpolarizar, reduzindo a liberação de
686 glutamato na fenda sináptica, o que por sua vez causará uma despolarização nas
687 células bipolares on, enquanto que as células horizontais ligadas aos fotorreceptores

da periferia não iluminada do campo receptivo sofrem despolarização, provocando a hiperpolarização das células off (BERNTSON; TAYLOR, 2000).

Assim, quando os sinais das células bipolares finalmente chegam às células ganglionares, será gerado um potencial de ação nestas células, cujos axônios irão se agrupar formando o nervo óptico e convergir para o disco óptico. O nervo óptico conduzirá este potencial para os centros superiores de processamento visual (LENT, 2010).

2.2.3. Suprimento sanguíneo da retina

A artéria oftálmica, ramo da artéria carótida interna, é responsável pela irrigação sanguínea ocular emitindo ramos responsáveis pelo suprimento das camadas internas da retina através da artéria central da retina, assim como também se ramifica em artérias ciliares posteriores que irrigam as camadas externas, coroide, corpo ciliar e íris (JONAS; DICHTL, 1996).

No sistema visual, a luz tem de atravessar toda a espessura da retina para alcançar os fotorreceptores, desta forma a distribuição espacial das estruturas vasculares deve interferir o menos possível com a passagem da luz. Na verdade, as estruturas vasculares representam menos de 5% da massa retiniana total. (GARDNER et al., 2002).

Nos Roedores, o suprimento sanguíneo à retina tem duas origens diferentes, a artéria central da retina e os capilares da coroide. Desde a zona mais interna da retina até à camada nuclear externa a vascularização realiza-se através da circulação intra-retiniana. Os restantes estratos mais externos dependem da circulação coroideana (65-85%). Estes dois sistemas vasculares encarregam-se de satisfazer as elevadas necessidades de oxigénio e glicose das células nervosas (KOLB et al., 2011).

Os Roedores possuem uma retina do tipo holoangiótico, o que significa que a árvore vascular tem origem na artéria central da retina e se ramifica, desde o disco do nervo óptico até à periferia, em arteríolas, vênulas e numa extensa rede de capilares (Figura 2). Os vasos sanguíneos retinianos distribuem-se por três plexos vasculares: o plexo vascular superficial, situado na camada ganglionar, o plexo vascular intermédio, à nível da camada plexiforme interna, e, mais profundamente, o

plexo vascular profundo que invade a camada plexiforme externa (PAQUES et al., 2003).

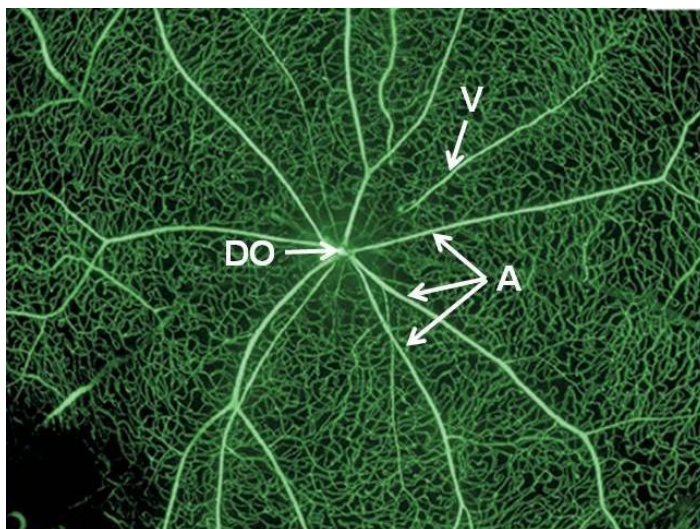


Figura 2 – Padrão vascular da retina de ratos. Injeção de fluoresceína. A partir do disco óptico a artéria central da retina ramifica-se em várias arteríolas retinianas que se distribuem radialmente até à periferia. As vénulas retinianas surgem num plano mais profundo e convergem no disco óptico. DO, disco óptico; A, arteríolas; V, vénula. Fonte: Dissertação de mestrado Joana Araújo Nobre Catita.

A retina consome oxigênio mais rapidamente do que qualquer outro tecido. As exigências de energia elevada do epitélio pigmentar da retina e dos fotorreceptores se deve a síntese dos componentes celulares necessários para a sua constante renovação (NGUYEN-LEGROS; HICKS, 2000). Prestação de uma oferta adequada de oxigênio e glicose fornece uma explicação para o alto fluxo sanguíneo na coróide, considerado como o mais elevado de todos os tecidos do corpo em termos de fluxo de sangue por unidade de massa de tecido (SHAO et al., 2011).

2.3 Retinopatia diabética

A retinopatia diabética (RD) é considerada uma doença vascular, com risco de perda da visão, que se apresenta clinicamente de acordo com o estado proliferativo da vasculatura retiniana (KOWLURU et al., 2001). Essa enfermidade envolve hemorragias, obliteração vascular, resultando em neovascularização e consequentemente a esses eventos, proliferação fibrovascular e desprendimento da retina, os quais secundariamente podem provocar degeneração neural da retina (OZAWA et al., 2011).

Estudos têm demonstrado que quase todos os pacientes com diabetes mellitus tipo 1, e mais de 60% dos indivíduos com diabetes tipo 2, têm algum grau de retinopatia após vinte anos de doença (ROBINSON et al., 2012). Estudos baseados na população atual sugerem que cerca de um terço dos diabéticos tem algum sinal de RD e aproximadamente um décimo apresenta seu grau avançado, incluindo seu estágio proliferativo e edema de mácula (WONG et al., 2008; WANG et al., 2009; ZHANG et al., 2010).

As alterações vasculares que ocorrem no início da RD não proliferativa, incluem dilatação dos vasos sanguíneos, obstrução capilar e degeneração, aumento de leucócitos e da permeabilidade associada à ruptura da barreira hemato-retiniana, perda de pericitos e formação de microaneurismas. O estágio avançado da RD proliferativa é caracterizada por neovascularização (KUSARI et al., 2010).

O único objetivo da circulação retiniana é apoiar as demandas metabólicas dos neurônios da retina e das células da glia, essas células também podem ser danificadas pelo estado do diabetes. (XIN et al., 2012). As células ganglionares da retina assumem um papel crítico de transmissão dos sinais visuais para o córtex cerebral antes do processamento de sinais. Assim, disfunção nas células gliais, neuronais e principalmente nas células ganglionares podem ocorrer concomitantemente com anormalidades no fluxo de sangue e, muitas vezes antes do aparecimento do dano microvascular evidente (ANTONETTI et al., 2006). Anormalidades da atividade eletrofisiológica da retina também podem ser detectadas antes do aparecimento clínico das lesões vasculares (BLOODWORTH, 1962; WOLTER; 1961).

Os três principais fatores de risco para a RD são o diabetes, a hiperglicemia e a hipertensão (CHEUNG; MITCHELL; WONG, 2010; GROSSO et al., 2011). O índice de massa corporal e a dispilidemia, possivelmente também são fatores, porém, as associações não têm sido tão consistentes (BENAROUS et al., 2011; DIRANI et al., 2011). Fatores genéticos também parecem estar envolvidos com essa doença, no entanto, genes específicos não têm sido claramente identificados, apesar de grandes estudos (ABHARY et al., 2009; SOBRIN et al., 2011).

Em relação à patogênese da RD, as alterações que contribuem para o estresse oxidativo e a baixa regulação de enzimas antioxidantes, desempenham um importante papel (MADSEN-BOUTERSEN; KOWLURU 2008; JARRET et al., 2008).

O estresse oxidativo, é considerado uns dos principais fatores envolvidos na patogênese da RD, e em outros desequilíbrios bioquímicos, como por exemplo, aumento do poliol, da hexosamina da proteína quinase C e das AGEs (produtos finais de glicação avançada), e estes desequilíbrios levam a alterações estruturais e funcionais, tais como perda acelerada de células capilares na microvasculatura retiniana, aumento na permeabilidade vascular e aumento na formação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (KOWLURU; CHAN, 2007; KAUR., 2008).

O VEGF é um fator angiogênico induzido por hipóxia (SHWEIKE et al.,1992) e um grande fator de permeabilidade vascular (SENGER et al.,1983) que surgiu como um mediador chave na permeabilidade da barreira hemato-retiniana na RD e em outras doenças isquêmicas (COSTA et al., 2007; ISHIDA et al., 2003).

A RD também compartilha similaridades com doenças inflamatórias crônicas devido ao aumento da permeabilidade vascular, edema, infiltração de células inflamatórias, destruição de tecidos, neovascularização, e a expressão de citocinas pró-inflamatória e quimiocinas na retina. O aumento da expressão de fatores vasoativos e citocinas provavelmente desempenham um papel importante na estrutura e nas alterações funcionais da retina (KHAN; CHAKRABARTI, 2007; (WIROSTKO; WONG; SIMO, 2008). No entanto, estudos em humanos não revelaram consistente associação entre a retinopatia e inflamação (LIM et al., 2010).

Em relação aos tratamentos disponíveis para a RD, no seu estágio mais avançado, a fotocoagulação a laser, a cirurgia de vitrectomia, as injeções intra-oculares de esteróides e anti-VEGF, apresentaram bons resultados, porém, não são úteis no início do tratamento e não evitam o risco de cegueira (CHEUNG; MITCHELL; WONG, 2010). O tratamento com laser é propriamente destrutivo, com efeitos colaterais inevitáveis, e também não é eficaz em reverter à perda da visão, da mesma forma, a terapia anti-VEGF apresenta risco sistêmico (TRUONG; WONG; KHACHIGIAN, 2011). Portanto, novas estratégias de tratamento preventivo ou que possam proporcionar intervenções nos estágios iniciais do diabetes atrasando ou impedindo sua progressão são necessários (ROBINSON et al., 2012).

2.4 Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio sintetizado principalmente pela glândula pineal, e também por outras fontes tais como: retina, células imunocompetentes, trato gastrointestinal, fígado, testículos, ovários (HARDELAND et al., 2011). Essas fontes extrapineal contribuiriam pouco para a concentração plasmática da melatonina, contudo, teriam importância considerável para ação parácrina e/ou autócrina desse hormônio (PONTES et al., 2006). Ela é um dos mais poderosos antioxidantes naturais (REITER et al., 1999) que evita danos oxidativos em macromoléculas, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (BAYDAS et al., 2004; REITER et al., 2001). Sua principal função biológica inclui a regulação do ritmo circadiano (fase de dormir e acordar), a melhoria da qualidade do sono (LI; ZHANG; TANG, 2013), a reprodução em espécies sazonais e não sazonais (BERGER, 2008) e a função da retina (BRZEZINSKI, 2005). Estudos também demonstraram que ela apresenta atividade anti-inflamatória, anti-apoptótica e antioxidante (LI; ZHANG; TANG, 2013).

Sua ação é ativada através da ligação retino-hipotalâmico, e, a partir da retina, faz com que os núcleos supraquiasmáticos (NSQ) recebam informações sobre a iluminação ambiental (REITER, 1981). As mensagens que partem do NSQ são transmitidas para neurônios do segmento cervical da medula, e, em seguida, são enviadas para os gânglios simpáticos cervicais superiores, e destes para a glândula pineal (HIRIART, 2012). O tecido da glândula pineal é altamente vascularizado e constituído de células conhecidas como pinealócitos que produzem melatonina e peptídeos como a vasopressina, e células da neuroglia, astrócitos do tecido nervoso (REITER, 1981).

A melatonina não é armazenada no local de síntese e, por conseguinte, é segregada diretamente para o líquido cefalorraquidiano e circulação vascular (REITER; TAN; FUENTES-BROTO, 2010).

O pico da secreção de melatonina é alcançada na primeira metade da noite, decaindo gradualmente (HIRIART, 2012). Em virtude das estações do ano, conforme os dias vão ficando mais curtos, a exposição dos animais à melatonina aumenta, informando ao organismo a duração da noite, e conseqüentemente, o período do ano correspondente (HARDELAND et al., 2011).

Existem três principais vias de degradação deste hormônio, sendo a hepática considerada a via clássica, onde a enzima CYP P450 do fígado metaboliza a

melatonina em 6-hidroxi-melatonina, que em seguida é conjugada com sulfato ou glucoronida, sendo então secretada na urina (SLOMINSKI et al., 2012). Quando a melatonina reage com o peroxinitrito, forma o metabólito 6-hidroxi-melatonina que manifesta uma atividade antioxidante maior em determinados modelos in vitro (REITER; TAN; BURKHARDT, 2002).

Por ser uma molécula anfipática, a melatonina pode atravessar passivamente a membrana celular e, dessa forma, pode regular diretamente reações/funções no interior das células, independentemente da interação com o receptor (DUBOCOVICH, 1997). Por outro lado, diversas ações da melatonina são mediadas por receptores de membrana em vários tecidos, como o receptor MT1 e o MT2, que permitem transmitir ritmicidade a estruturas que estão do lado de fora da barreira hematoencefálica (DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010). Há ainda outro tipo de receptor, o MT3, que apresenta classificação controversa, podendo ser considerado também como enzima, a quinona redutase II, que regula a adesão dos leucócitos no endotélio vascular (VINCENT et al., 2010).

A expressão do receptor MT1 ocorre principalmente no sistema nervoso central (SNC), em órgãos reprodutores, rim, fígado, vasos e pele (PANDI-PERUMAL et al., 2008). Já o MT2 é expresso de forma mais restrita, sendo encontrada principalmente no cérebro e retina, embora sua presença também tenha sido detectada no pulmão, células do sistema imunológico, duodeno e adipócitos (PANDI-PERUMAL et al., 2008). Esses receptores têm afinidades diferentes para a melatonina, sendo cerca de três vezes maior para o MT1 em relação ao MT2 (WITT-ENDERBY et al., 2003). Além disso, os receptores podem atuar como monômeros ou dímeros, sendo que a presença de heterodímeros MT1/MT2 e o homodímero MT1 são mais prevalentes em relação ao homodímero MT2 (ZLOTOS et al., 2013).

Foi descrito que, na retina os receptores MT1 e MT2 formam heterodímeros e que a ausência de um dos receptores inviabiliza o efeito da melatonina neste tecido (BABA et al., 2013).

Alguns dos efeitos importantes da melatonina são: atuar como transdutor neuroendócrino, integrando os sinais neurais da retina, que depende da duração e intensidade da iluminação ambiental, liberando sinais na corrente sanguínea sincronizando os ritmos circadianos (CHAHBOUNI et al., 2010). Além do controle do ciclo circadiano, ela vem sendo atrelada com diversas funções específicas, estando

relacionada ao envelhecimento, a obesidade, a sensibilidade a insulina, a maturação sexual, as ações antidepressivas, ao controle das secreções de hormônios (do crescimento, hormônios adrenais e tireoideanos), e como agente antioxidante, substância oncoestática, substância cardioprotetora, mediador inflamatório e substância osteogênica (PANDI-PERUMAL et al., 2006).

2.5 Melatonina e diabetes

A avaliação das relações entre diabetes, metabolismo da glicose, e os efeitos da melatonina é um tema de grande interesse (DERLACZ et al., 2005). Foi sugerido que tratamentos com antioxidantes podem ser uma importante opção terapêutica na prevenção das complicações vasculares causadas pelo diabetes (BONJUGA et al., 2004). A proteção antioxidante da melatonina já foi demonstrada tanto *in vivo* como *in vitro* ao nível de membrana celular, mitocôndrias e núcleo (REITER, 2000). Além de suas ações como um eliminador de radicais livres, ela também estimula enzimas antioxidantes, como por exemplo a superóxido dismutase a glutathione peroxidase e a glutathione reductase, o que promove ainda mais a sua capacidade de reduzir a toxicidade dos radicais livres e dos seus reagentes associados (REITER et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2004). Pesquisas mostraram que melatonina poderia restaurar o status antioxidante prejudicado em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (ANWAR; MEKI, 2003). Da mesma forma, sua administração à longo prazo reduziu a hiperlipidemia e a hiperinsulinemia e restaurou a relação dos ácidos graxos poliinsaturados no soro e tecidos de ratos diabéticos (NISHIDA, 2005).

Estas ações combinadas da melatonina, juntamente com sua baixa toxicidade e sua capacidade de penetrar todas as membranas morfofisiológicas, a torna um benéfico antioxidante em todo organismo (TOPAL et al., 2005; LEE et al., 2005)

2.6 Melatonina e retina

Embora a melatonina seja mais amplamente conhecida como um produto da glândula pineal, sua síntese também ocorre em local extra-pineal, em vertebrados e em plantas (SIU et al., 2006). No olho, a melatonina sintetizada modula o segmento

externo do fotorreceptor (GRACE; CHIBA; MENAKER, 1999) e a sensibilidade à luz (DJAMGOZ et al., 1997).

Os olhos, como outras estruturas, estão sujeitas a estresse oxidativo, persistente na forma de espécies reativas ao oxigênio (ROS) ou, ao nitrogênio (RNS), mediante a oxidação de moléculas essenciais, e esses agentes contribuem para uma variedade de doenças de estruturas oculares, entre elas, a retinopatia da prematuridade, a retinite pigmentosa, a catarata, o glaucoma entre outras (SIU et al., 2006).

A retina responde ao meio hiperglicêmico hipóxico por meio de várias alterações bioquímicas. A produção desregulada de VEGF pela mesma é uma das respostas mais devastadoras para o estresse oxidativo (MADSEN-BOUTERSE; KOWLURU, 2008). Estudos mostram que na retina hipóxica, a qual é uma condição patológica na retinopatia diabética, apresentava conteúdo de melatonina mais baixo, e que a suplementação da dieta com melatonina inibe a produção de VEGF na retina (KAUR et al., 2007).

Outras pesquisas também mostraram que a melatonina também é capaz de modificar a peroxidação lipídica das células da retina de ratos sob alto teor de glicose (BAYDAS et al., 2004). Além disso, ela preserva os níveis de glutathione no citoplasma e nas mitocôndrias, eliminando os danos oxidativos nesses locais (LEON et al., 2005).

Essas ações desse hormônio ajudam a proteger as estruturas oculares do abuso dos radicais livres, eliminando esses radicais, preservando a regulação das atividades das enzimas antioxidantes e aumentando a atividade de transferência de elétrons da mitocôndria, evitando assim, a geração de radicais livres (SIU et al., 2006).

2.7 Eletroretinograma

A eletroretinograma (ERG) é um exame oftálmico que consiste no registro da atividade elétrica produzida pelas células da retina, obtidos a partir de um estímulo luminoso difuso (flashes), o qual é projetado no olho, sendo esta atividade captada pela superfície da córnea (MARMOR et al., 2009). Trata-se de um meio para estudar a função da retina, sendo um método não invasivo e de fácil realização, permitindo

um manejo seguro, mesmo nos casos que se faz necessário a aplicação de anestesia (NUSINOWITZ; HECKENLIVELY, 2006).

É utilizado tanto na medicina humana quanto na veterinária como importante modelo biológico para estudo das degenerações da retina como nos casos de intoxicação, diabetes e catarata (PETERSEN-JONES et al., 2006).

O registro de eletrorretinograma pode ser feito sobre diferentes condições de adaptação, sendo possível isolar e analisar o sistema de cones e bastonetes, por meio da manipulação da intensidade de luz e o nível de adaptação do animal (adaptado ao escuro, ou, ao claro), obtendo-se registros escotópicos ou fotópicos.

As duas principais ondas estudadas no eletrorretinograma são: a ondas *a* e a onda *b*. A primeira refere-se à hiperpolarização dos fotorreceptores e a segunda, à despolarização das células bipolares ocasionada pelo aumento da concentração de potássio na parte interna da retina e pela ativação das células bipolares-*on* (ZHANG; WU, 2003)

Como método para facilitar e comparar a eletrorretinografia em diferentes laboratórios e clínicas a Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica da Visão (ISCEV), padronizou um protocolo que visa analisar as seguintes respostas (MARMOR et al., 2008): escotópica de bastonetes, escotópica máxima, escotópica de potenciais oscilatórios, fotópica de cones ao flash único e fotópica de flicker.

A camada fotorreceptora da retina apresenta dois tipos de células: os cones e os bastonetes. Os cones trabalham em condições fotópicas e os bastonetes em condições escotópicas (DANTA; COSTA, 1995). A maioria dos vertebrados apresentam um tipo de bastonete e três tipos de cones: cones vermelhos, verdes e azuis, de acordo com os pigmentos visuais encontrados em seus segmentos externos (DANTA; COSTA, 1995).

Na escotópica de bastonetes, após adaptação ao escuro é a primeira resposta a ser analisada, com estímulo de flash de luz branca com sua intensidade máxima atenuada em 2,5 unidades de logarítmicas utilizando-se filtros de densidade neutra. Este tipo de iluminação, como está abaixo do limiar de resposta para os cones, produz apenas respostas de bastonetes (MARMOR et al., 2004).

Já a escotópica máxima é obtida com estímulos de alta intensidade e apresenta tanto resposta para os cones quanto para os bastonetes. A estimulação é

feita no estado adaptado ao escuro e sem luz de fundo, com intervalo de no mínimo dez segundos entre cada estimulação devido à alta intensidade do estímulo (MARMOR et al., 2004).

A escotópica de potencial oscilatório são quatro a dez ondas de baixa amplitude e alta frequência sobrepostas na onda *a* ou no ramo ascendente da onda *b* do eletroretinograma (SIMS, 1999). São altamente correlacionadas com uma circulação retiniana intacta, sendo então, indicadores de sensíveis isquemia retiniana (SEVERNS; JOHNSON; BRESNICK, 1994). Yonemura e colaboradores (1962) observaram que as ondas *a* e *b* apresentavam-se normais em retinopatias de grau leve, enquanto o potencial oscilatório estavam diminuídos ou ausentes.

Os potenciais oscilatórios (PO) são facilmente produzidos quando a retina é estimulada com uma luz de alta intensidade e alta frequência (SEVERNS; JOHNSON; BRESNICK, 1994). Os olhos devem estar adaptados ao escuro e utiliza-se o mesmo standar flash branco, com um filtro de 75 a 100 HZ e com intervalo interestímulo de quinze segundos, os potenciais aparecem na porção ascendente na máxima resposta (MARMOR et al., 2004).

Vários estudos foram realizados para descrever as alterações dos potenciais oscilatórios em pacientes diabéticos, nos quais se detectou ausência ou diminuição dos mesmos nos casos de retinopatia diabética em grau avançado (LI et al., 1992). Ela é uma importante ferramenta para identificar isquemia retiniana interna, degenerações retinianas pigmentarias, glaucoma, Alzheimer, além de pacientes diabéticos com risco de desenvolverem retinopatia proliferativa (SIMS, 1999).

A análise do PO pode ser feita pela soma das amplitudes dos quatros componentes predominantes da resposta do eletroretinograma ou somar as amplitudes de todos os picos, denominados índice oscilatório (NUSINOWITZ; HECKENLIVELY, 2006).

Um outro ponto a ser analisado no eletroretinograma é a resposta fotópica de cones a flash isolado, nele, só é refletida a atividade dos cones, obtida através da saturação dos bastonetes através de uma luz branca de fundo com luminância da luz de 17 a 34 cd/m², é feito um período de adaptação à luz de dez minutos, pois as respostas dos cones tendem a crescer nos primeiros minutos, a intensidade do estímulo luminoso é máxima (MARMOR et al., 2004).

Por fim, têm-se a fotópica de flicker, nela, a resposta à estimulação intermitente em uma frequência de 30 Hz (60 reversões entre claro e escuro/segundo) é registrada na presença de luz de fundo (34 cd/m^2), após um período de adaptação à luz de dez minutos isolando-se a respostas dos cones, o tamanho da resposta é medida do pico da resposta mínima ao pico da resposta máxima. O tempo de culminação da onda *b* é medido a partir do início do estímulo até o pico máximo da onda *b* (MARMOR et al., 2004).

2.8 Componentes analisados no eletrorretinograma

A resposta elétrica resultante de um estímulo gerado por uma corrente alternada de curta duração é constituída por três ondas básicas, bifásica, apresentando a forma senoidal, com um componente negativo (onda-*a*), um positivo (onda-*b*) e a onda-*c* (SANTIESTEBAN et al., 2005). A origem dessas ondas ocorre a partir de tipos específicos de células que compõem a retina (MARMOR et al., 2009).

A onda-*a* é formada pelas correntes iônicas extracelulares geradas pelos fotorreceptores (cones e bastonetes), ou seja, ela resulta da hiperpolarização dos fotorreceptores, originando uma onda com amplitude negativa, mensurada a partir da linha de base até o pico da mesma, apresenta dois componentes, um rápido e um lento (Figura 3). (SANTIESTEBAN et al., 2005). O componente rápido resulta da reação do fotopigmento à presença de luz, o segundo constitui a transmissão do sinal gerado pelo fotorreceptor, a inclinação da onda que resulta da diminuição dos níveis de potássio K^+ dos fotorreceptores pela ação das células de Müller (SANTIESTEBAN et al., 2005).

A onda-*b* (Figura 3) representa amplitude positiva, reflete principalmente a atividade das células bipolares da retina, que se encontram entre os fotorreceptores e as células ganglionares, transmitindo os sinais dos fotorreceptores para as células ganglionares (HECKENLIVELY; ARDEN, 2006).

A onda-*c* (onda positiva de aparecimento bem mais tardio) está relacionada com a polarização do epitélio pigmentar da retina (EPR) e pode ser observada quando é feito um tipo especial de ERG, o ERG de longos flashes (GUM, 1980).

Enquanto as ondas *a* e *b* aparecem na escala de milisegundos, a onda *c* aparece na escala de segundos. O aparecimento da onda-*c* no epitélio pigmentar da

retina depende do fluxo de potássio das outras camadas da retina. Só que o fluxo extracelular de potássio depende da fototransdução. Portanto, a onda-c pode nos dar um panorama da fototransdução como um todo, da integridade do epitélio pigmentar da retina e da interação do EPR e do resto da retina. A pesquisa da onda-c não é rotineira, geralmente só é pesquisada quando já se sabe que há algo errado com o ERG de flash-padrão e, conseqüentemente, com a retina (GUM, 1980).

Para interpretar clinicamente o ERG, a mensuração da amplitude da onda-b em microvolts (μV) é a mais utilizada, pois além de ser maior, é a onda mais fácil de mensurar seu ápice (KOMAROMY et al., 1998). Onda-b com baixa amplitude significa diminuição do número total de fotorreceptores (KOMAROMY et al., 1998). Teoricamente, as amplitudes das ondas a e c também podem ser usadas para interpretar função retiniana. A mensuração da amplitude da onda-b é feita do ponto mais negativo da onda-a até o ponto mais positivo da onda-b e é denominada de amplitude pico a pico (SALOMÃO, 2002).

Em doenças vasculares da retina observa-se diminuição da amplitude da onda-a e onda-b que foi primeiramente descrito por Henkes em 1953 em pacientes que apresentavam oclusão da artéria central da retina.

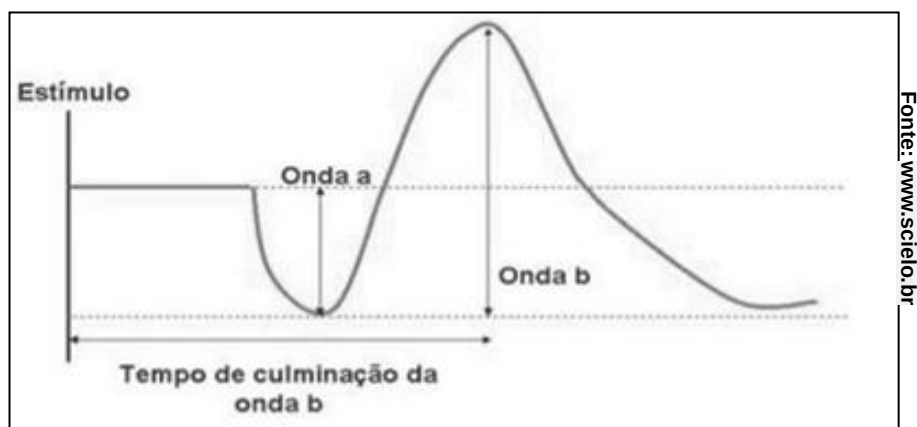


Figura 3: esquema das ondas a e b do eletrorretinograma.

2.9 Eletrorretinograma e enfermidades

A eletrorretinograma é o exame utilizado para confirmação da perda das células fotorreceptoras da retina (CULLEN; GRAHN, 2002). Na medicina, é usada tanto pra diagnosticar como para avaliar a progressão de degenerações da retina, intoxicações, e, no caso de pacientes diabéticos, para diagnosticar e acompanhar a retinopatia proliferativa e não prolíerativa (MARMOR et al., 2003). Sendo importante porque alterações no padrão do ERG podem preceder alterações de fundo de olho em algumas doenças (BEREZOVSKY et al., 2005).

O diabetes melitus tipo dois, no qual, alguns pacientes apresentaram alguns componentes alterados no eletrorretinograma de campo total com fundo de olho normal, diminuição da amplitude da onda *b* e dos potenciais oscilatórios e aumento das latências (GUALTIERI, 2004). Reduções de amplitudes e aumento de latência também foram encontradas no eletroerretinograma multifocal (GUALTIERI, 2009).

Em ratos diabéticos, Sakai et al. (1995), observaram que a amplitude e o pico de latência das ondas *a* e *b* não diferenciaram daquelas do grupo controle, no entanto, apresentaram uma amplitude significativamente menor do potencial oscilatório.

A catarata, a qual é responsável pela principal causa de cegueira em cães em diferentes idades, principalmente da raça poodle (ADKINS; HENDRIX, 2005). Nesta enfermidade, ocorre a impossibilidade para a oftalmoscopia e detecção de qualquer anormalidade no segmento posterior, fazendo com que o eletrorretinograma se torne uma ferramenta indispensável (SAFATLE et al., 2010). Pesquisas em cães demonstraram que quanto mais jovem, maiores são as amplitudes e quanto mais velhos menores são as amplitudes de respostas (NARFSTRÖM et al., 2002).

Na retinopatia diabética, o resultado do exame de eletrorretinograma pode ser afetado logo no início do diabetes mellitus. Sendo, o conhecimento do início do tratamento da retinopatia diabética e o monitoramento dos seus efeitos através deste exame necessários para detectar as alterações subclínicas desta enfermidade (PALMOWSKI et al., 1997).

Para pacientes diabéticos com retinopatias, a magnitude do atraso de tempo no eletrorretinograma correlaciona-se com a gravidade da retinopatia diabética e

localizações anormais do mesmo está correlacionado espacialmente com anormalidades anatômicas (GREENSTEIN et al., 2000).

A capacidade de prever locais na retina de futuras retinopatias baseados em eletrorretinogramas, oferece aos médicos uma ferramenta poderosa para tratamento profilático precoce do tecido da retina em pacientes diabéticos, auxiliando também a identificação de populações de riscos (BEARSE et al., 2006).

2.10 Estresse oxidativo e diabetes

O estresse oxidativo (EO) pode ser definido como um desequilíbrio persistente entre a produção de espécies moleculares altamente reativas (principalmente oxigênio e nitrogênio) e defensores antioxidantes (ROSEN et al., 2001). Ele é o resultado do aumento do conteúdo de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e/ou espécies reativas ao nitrogênio (RNS) (EVANS et al., 2003). Exemplos de ROS incluem os superóxidos, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio (ROSEN et al., 2001). As ROS, induzem injúria endotelial, modificação oxidativa das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e indução de genes sensíveis ao redox incluindo proteínas quimioatrativas de monócitos 1 e moléculas de adesão, tais como moléculas de adesão de células vasculares (CREAGER et al., 2003).

O EO pode ser amplificado pelo ciclo auto-catalítico de estresse metabólico, dano tecidual e morte celular, os quais conduzem a um aumento simultâneo na produção de radicais livres e comprometimento do mecanismo inibidor, o que agrava ainda mais essa situação (BAYNES, 1991).

Ele desempenha um papel primordial no desenvolvimento das complicações do diabetes, ambos a nível microvascular e cardiovascular (GIACCO; BROWNLEE, 2010). As anormalidades metabólicas do diabetes causam superprodução mitocondrial de superóxido nas células endoteliais dos pequenos e grandes vasos e também no miocárdio (GIACCO; BROWNLEE, 2010).

O aumento da produção de superóxido causa a ativação das cinco principais vias envolvidas nessa patogênese que são: via de fluxo poliol, aumento da formação de produtos finais de glicação avançada (AGES), aumento da expressão de receptores para AGES e ativação do seu ligante, ativação de isoformas da proteína C quinase (PKC) e hiperatividade da via hexosamina e, concomitantemente, são

1138 inativadas duas enzimas antiateroscleróticas: o óxido nítrico sintase endotelial e a
1139 sintetase prostaciclina (GIACCO; BROWNLEE, 2010).

1140 Várias linhas de pesquisa concordam que esses cinco mecanismos são
1141 ativados por um evento chave: superprodução mitocondrial de espécies reativas ao
1142 oxigênio (BROWNLEE, 2005). Na microcirculação dos diabéticos, isso é
1143 consequência da hiperglicemia intracelular. Ao contrário, na macrovasculatura e no
1144 coração parece ser consequência do aumento da oxidação dos ácidos graxos em
1145 que resulta na deterioração da função das células β e em parte da via de resistência
1146 à insulina (GIACCO; BROWNLEE, 2010; POITOUT; ROBERTSON, 2002).

1147 Estudos também têm relatado que a hiperglicemia tem implicado na ativação
1148 de vias bioquímicas adicionais, incluindo a via de sinalização ativada por estresse do
1149 fator nuclear Kb (NF-kB), a via da proteína quinase ativada por estresse jun quinase
1150 NH2-terminal (JNK/SAPK) e a via da proteína quinase ativada por mitógeno p-38
1151 (MAP) (BARNES; KARIN, 1997; KYRIAKIS; AVRUCH, 1996).

1152 A via (NF-kB), desempenha um papel chave na resposta imune, inflamatória e
1153 na apoptose (EVANS et al., 2003). Ela regula a expressão de um grande número de
1154 genes, incluindo vários ligados as complicações do diabetes como por exemplo o
1155 fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o receptor para AGES
1156 (MOHAMED et al., 1999). Regulação inadequada desta via está relacionada com
1157 doenças crônicas como o diabetes e a aterosclerose (EVANS et al., 2003).

1158 Estudos em células endoteliais de bovinos mostraram que a exposição à
1159 hiperglicemia aumenta a produção intracelular de espécies reativas ao oxigênio
1160 seguida pela ativação do NF-kB (NISHIKAWA et al., 2000).
1161 Consequentemente, ocorre o aumento nos níveis de sorbitol, AGE e PKC. Portanto,
1162 o efeito da hiperglicemia na formação de ROS e na ativação de NF-kB precede a
1163 estimulação de outros sistemas (EVANS et al., 2003).

1164 As vias JNK/SAPK e a MAPK p38 são conhecida como quinase ativadora de
1165 estresse, sendo responsável por uma variedade de estímulos indutores do estresse
1166 endógeno e exógeno como por exemplo a hiperglicemia, o estresse osmótico as
1167 citocina pro-inflamatórias, irradiação ultravioleta, ROS, choque térmico e irradiação
1168 ultravioleta (HO et al., 2000; NATARAJAN et al., 1999). A via MAPK p38 é ativada
1169 em resposta a hiperglicemia e ao diabetes. Aumento nos níveis de MAPK p38 e
1170 JNK/SAPK tem sido relatado em tecido nervoso de pacientes com diabetes tipo um

e diabetes tipo dois, no entanto, seu papel na fisiopatologia não tem sido estabelecido (PURVES et al., 2001)

Estresse oxidativo crônico ou excessivo pode interferir com a função normal dos tecidos afetados pela hiperglicemia diabética, tanto pelo aumento do fluxo sanguíneo e distúrbio na hemodinâmica da retina (KOWLURU; KENNEDY, 2001), quanto pela contratilidade da vasculatura do músculo liso (SHARPE et al., 1998) e diminuição da condutividade neural nos nervos periféricos (HOUNSOM et al., 2001). Estudos têm comparado a retinopatia diabética a doenças inflamatórias crônicas de baixo nível, em que os capilares da retina tornam-se não perfundidos e isquêmicos e o número de trombos de plaqueta de fibrina elevados (JOUSSEN et al., 2001).

Um mecanismo patogênico associado ao diabetes e à hiperglicemia seria a desregulação dos níveis de espécies ativas de oxigênio, especialmente do radical superóxido (GOTTLIEB et al., 2009). No caso, a hiperglicemia induziria um processo de superprodução de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria. Quando ocorre aumento na diferença de potencial eletroquímico (gradiente de próton) produzida na membrana interna da mitocôndria, o tempo de vida das moléculas que levam à produção do ânion superóxido também aumenta. Este prolongamento na manutenção destas moléculas tem como consequência a elevação nos níveis de superóxido (GOTTLIEB et al., 2009).

Deste modo, a hiperglicemia induz a uma grande produção do ânion superóxido, o qual causa estresse oxidativo. Assim, parece que o estresse oxidativo promove um ambiente favorável para o desenvolvimento do diabetes e vice versa, uma vez que hiperglicemia aumenta esse fator, o que pode levar à aterosclerose (GOTTLIEB et al., 2009). Além disso, o EO contribui para aterogênese induzindo a lipoperoxidação e a expressão de várias citocinas e moléculas de adesão (GOTTLIEB et al., 2009).

Muitas fontes de ROS contribuem para o aumento do estresse oxidativo, no entanto NADPH oxidase e suas subunidades catalíticas é a única família de enzimas conhecidas dedicada exclusivamente à produção de ROS (LALEU et al., 2010; JIANG et al., 2012). Além disso, suas isoformas estão aumentadas na presença de glicose elevada, tornando esta família de enzimas um excelente candidato para serem tratadas nas desordens vasculares do diabetes (AOYAMA et al., 2012). Várias isoformas da NADPH oxidase estão presentes na vasculatura, a 1, a 2, a 4, e

a 5. Estas isoformas foram propostas para desempenhar um papel importante na fisiopatologia vascular, induzindo tanto a inflamação quanto fibrose (SOURRIS et al., 2010).

A consequência mais estudada do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica (LEITE; SARNI, 2003). Ela pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre os lípidos insaturados das membranas celulares, gerando principalmente radicais alquilas, alcóxilas e peróxilas, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, morte celular (BENZIE, 1996).

A formação de radical peróxil danifica diretamente a membrana celular por modificações em sua fluidez, permeabilidade e integridade. Para a avaliação desse evento o método mais frequente utilizado é a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (LEITE; SARNI, 2003). Níveis elevados de TBARS têm sido identificados em pacientes críticos com sepse e falência de múltiplos órgãos (LEITE; SARNI, 2003). Além disso, ela desempenha um importante papel na aterosclerose e complicações do diabetes mellitus (JAIN; LEVINE, 1990).

A defesa do organismo contra espécies reativas ao oxigênio vai desde a prevenção à formação das ROS, interceptação dos radicais formados, a reparo das células danificadas (ROSA, 2013). Os sistemas que previnem a formação são considerados biomoléculas ligantes de metais (Fe^{2+} e Cu^+), ou seja, são quelantes (ROSA, 2013). A presença de proteínas quelantes é de vital importância para os seres vivos, pois previne as células de processos oxidativos catalisados por íons metálicos (ROSA, 2013).

As enzimas que controlam os níveis de ROS são Glutathione peroxidase (GPx), Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT), sendo sua ação a desativação das espécies reativas de forma a impedir a oxidação posterior de outras moléculas (ROSA, 2013). A desativação final de um composto com um ou mais elétrons não emparelhados consiste na formação de outro produto não radical (ROSA, 2013). O antioxidante mais eficiente deve combinar propriedades como reagir com radicais livres tais como o peróxil (ROO) e posteriormente reagir com compostos hidrossolúveis para sua própria regeneração (HALLIWELL, 2007). Os compostos hidrossolúveis transferem a função radical para longe do sítio-alvo potencial e são chamados de “scavenger” de radicais livres (HALLIWELL, 2007).

A glutathione (GSH) é uma molécula ubíqua produzida intracelularmente em todos os órgãos e tipos celulares, porém, mais abundante no fígado e pulmões (MONTEIRO, 2012). Em torno de 85 a 90% estão livremente distribuídos no citoplasma, no entanto podem estar também compartimentalizados em organelas como mitocôndrias, peroxissomos, matriz nuclear, e retículo endoplasmático (MONTEIRO, 2012). Como maior antioxidante intracelular do organismo, a depleção do GSH pode ser tanto causa como pré-requisito para formação de ROS (FRANCO et al., 2007).

Ela é um tripeptídeo composto pelos aminoácidos glutamina, cisteína e glicina. Sua síntese requer a ação consecutiva de duas enzimas a γ -glutamylcisteína (γ -CGS) e a glutathione sintetase (GSS) (MONTEIRO, 2012). A GSH também pode ser sintetizada por meio de vias de recuperação que envolvem seu catabolismo ou por intermédio de reciclagem após sua oxidação pela enzima glutathione redutase (FRANCO et al., 2007). Além disso, ela detoxifica uma série de compostos por meio da enzima glutathione S-transferase (GST) e das glutathiones peroxidases (GPXs) (MONTEIRO, 2012).

Estudos mostraram que o DM causa profundas alterações no metabolismo e transporte do GSH, que medeia o estado redox da célula (MONTEIRO, 2012). Diversas complicações do diabetes mellitus como lesões nervosas periféricas, malformações fetais e angiopatias têm sido associado à depleção do GSH e, consequentemente a formação de substâncias reativas ao oxigênio (FRANCO et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que sua concentração apresentou-se diminuída em pacientes com DM e complicações microvasculares, correlacionando-se diretamente com o controle glicêmico (DINCER; ALADEMIR; ILKOVA, 2002).

Estudos em humanos sugeriram que terapia antioxidante com vitamina E podem normalizar a hemodinâmica da retina, conhecido por ser afetado na pré-clínica da retinopatia e também pode ser importante terapeuticamente na alteração do curso da retinopatia diabética (CLERMONT, 1998). Estudos in vitro com modelo animal de diabetes têm mostrado que antioxidantes, especialmente o ácido α lipóico melhora a sensibilidade a insulina (MADDUX et al., 2001; PACKER et al., 2000).

Kowluru et al. (2001), em estudo com ratos diabéticos que receberam dieta suplementada com antioxidante durante longo tempo (entre 12 e 18 meses),

mostraram que houve uma inibição dos estágios iniciais da retinopatia diabética e os mecanismos pelo qual ela age.

Vários ensaios clínicos embora pequenos e de curta duração, também demonstraram que o tratamento com vitamina E, vitamina C ou glutatona melhora a sensibilidade à insulina em indivíduos com resistência à insulina e ou pacientes com diabetes tipo dois (EVANS; GOLDFINE, 2000). No entanto, de acordo com Ozguner; Bardak; Comlekci (2006) o tratamento com melatonina na dosagem de $100\mu\text{g Kg}^{-1}$ em ratos submetidos à radiação eletromagnética reduziu o estresse oxidativo na retina. Isso demonstra que a melatonina pode ser um hormônio promissor para o tratamento de doenças oculares associadas ao diabetes. Assim, há a necessidade de desenvolvimento de modelos experimentais que possam investigar o mecanismo de ação da melatonina nas patologias oculares, principalmente na retinopatia diabética.

2.11. Citocinas inflamatórias envolvidas na retinopatia diabética

A patogênese do diabetes mellitus é vista como um processo multifatorial (CHERNYKH et al., 2014). Essa patogenicidade ocasiona distúrbios metabólicos vasculares locais e sistêmicos as quais levam ao aparecimento de lesões na visão (CHERNYKH et al., 2014).

A literatura mostra que pacientes com RD apresentaram ativação de reações inflamatórias, violação do estado funcional do sistema imune e também desequilíbrio nos processos de intercelulares indutores de citocinas, matriz de metaloproteinase, fatores de crescimento e outros elementos (KHODJAEV et al., 2011). Identificar essas desordens indica sua absoluta importância na patogênese da RD (KHODJAEV et al., 2011).

A inflamação crônica é caracterizada por aumento da permeabilidade vascular, edema, infiltração celular, liberação de citocinas, destruição tissular, neovascularização e tentativa de reparo (SERRARBASSA; DIAS; VIEIRA, 2008). A retinopatia diabética exhibe a maioria destas alterações. A micróglia está intimamente associada com neurônios que exprimem moléculas que regulam negativamente a ativação microglial através de seus respectivos receptores. Logo, uma alteração dessa regulação durante o estresse poderia ativar a microglia para produzir citocinas

inflamatórias (SCHRODER; PALINSKI; SCHMID-SCHONBEIN, 1991). A microglia ativada produz substâncias que induzem a adesão de moléculas, as quais podem promover o acúmulo de neutrófilos no endotélio induzindo o extravasamento de macrófagos (CAICEDO et al., 2005).

Os processos fisiológicos de reparo que auxiliam as células retinianas a sobreviverem ao estresse incluem a liberação aumentada de diversos fatores de crescimento e citocinas, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), IGF-1, interleucina-1 e fator de necrose tumoral (TNF) (SERRARBASSA; DIAS; VIEIRA, 2008). Estas proteínas que têm sido implicadas no desenvolvimento da RD, também provêm funções neurotróficas para apoiar a sobrevivência das células da retina (GARIANO; GARDNER, 2005). O aumento da liberação de citocinas pode servir como uma função adaptativa para manter a função neuronal mas, ao mesmo tempo se a liberação for exagerada, causa dano vascular progressivo resultando em edema macular e neovascularização (GARIANO; GARDNER, 2005). Assim, este ciclo vicioso perpetua tanto o dano vascular como o neural e culmina nas características clínicas da RD (ANTONETTI et al., 2006).

2.11.1. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

O VEGF pertence a um grupo de glicoproteínas diméricas que inclui o fator de crescimento placentário (PLGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, e VEGF-F (CAPP et al., 2009). O VEGF-A é uma citocina potente e multifuncional que exerce seu efeito no endotélio, sendo o mais bem estudado e compreendido (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997). O VEGF-B está envolvido na angiogênese embrionária, especificamente no tecido do miocárdio (GOLOGORSKY; THANOS; VAVVAS, 2012). O tipo C é o principal fator originador da vasculatura linfática, e o VEGF-D é necessário para o desenvolvimento da vasculatura linfática bronquiolar (GOLOGORSKY; THANOS; VAVVAS, 2012). O tipo E é achado em vírus e o PLGF é importante na vasculogênese, além de desempenhar um papel na angiogênese como na isquemia induzida, bem como na inflamação e a cicatrização de feridas (GOLOGORSKY; THANOS; VAVVAS, 2012).

Essa citocina atua direta e seletivamente através dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, expressados predominantemente, no endotélio vascular (DVORAK et al.,

1995). A ligação do VEGF a esses receptores causa influxo de cálcio citoplasmático, aumentando sua concentração em até quatro vezes, mudança da forma, divisão e migração celular (DAWSON et al., 2006). Esse aumento da permeabilidade das vênulas às macromoléculas permite que proteínas plasmáticas extravasem para o espaço extravascular, levando a coagulação do fibrinogênio e deposição de gel de fibrina que serve como matriz provisória para o crescimento de novos vasos sanguíneos (FERRARA, 2004). O aumento da permeabilidade microvascular parece, invariavelmente, preceder e/ou acompanhar a angiogênese numa variedade de processos fisiológicos e patológicos, fazendo com que o VEGF seja um importante mediador de angiogênese (NAGY et al., 2008).

Michaelson em 1948 postulou a existência de um fator angiogênico difusível, liberado pela retina isquêmica. Por ser induzido por hipóxia, o VEGF tornou-se um forte candidato como mediador de neovascularização intraocular patológica (VALIATTI et al., 2011). Além disso, em pacientes com diabetes mellitus e retinopatia diabética proliferativa, foram observado que essa citocina apresentava níveis maiores no humor aquoso e vítreo do que no plasma, o que possivelmente está relacionado com a atividade da RD (FUNATSU et al., 2002).

O aumento dos níveis de VEGF ocular na RD só reforça o papel da neovascularização no curso desta doença (GOLOGORSKY; THANOS; VAVVAS, 2012). Terapias anti-VEGF tem sido alvo de numerosas drogas e ensaios clínicos para o tratamento da retinopatia diabética proliferativa (RDP) e edema de macula diabético (GOLOGORSKY; THANOS; VAVVAS, 2012).

2.11.2. Interleucina 6 (IL-6) e Fator de necrose tumoral (TNF- α)

Estudos também têm demonstrado significativo aumento nas concentrações IL-6 e TNF- α em pacientes com RDP. Estas observações confirmam a natureza inflamatória e imunológica da fisiopatologia dessa enfermidade (GOLOGORSKY; THANOS; VAVVAS, 2012).

Isto é significativo, porque o TNF- α desempenha um importante papel na neovascularização e reatividade vascular, em adição as suas atividades pró-inflamatórias. Ela também está diretamente envolvida na inflamação por meio de

uma indução de citocinas, envolvimento em quimiotaxia de monócitos, e estimulação de moléculas de adesão no endotélio da retina (ELNER et al., 1997).

TNF- α é produzido principalmente por macrófagos, monócitos e células T (DONG et al., 2007). Ela desencadeia a via extrínseca da apoptose e age através dos seus dois receptores primários, TNFR1 (P55) e TNFR2 (p75) (BERGER et al., 2008). Além disso, ela tem um papel significativo na função e morfologia nos danos da retina após injúria isquêmica, agindo através dos seus receptores (MARCHETTI et al., 2004).

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina com atuação tanto na resposta imune inata como na adaptativa (GOMES; NETO; BISPO, 2009). Ela é sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos e também à estimulação por outras citocinas, principalmente interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (SOUZA et al., 2008).

Além disso, a IL-6 se constitui em um importante marcador inflamatório, tal como seu receptor (gp 130), é amplamente expresso durante reações inflamatórias produzindo efeitos indesejáveis em vários órgão (TONET et al., 2008).

Essa citocina normalmente é expressa em baixos níveis, exceto durante infecção, trauma ou outros fatores estressantes (SOUZA et al., 2008). Entre os vários fatores que regulam a expressão do gene da IL-6, estão o estrógeno e a testosterona (GOMES; NETO; BISPO, 2009). Após a menopausa ou a andropausa, os níveis de IL-6 são elevados mesmo na ausência de infecção, trauma ou estresse (ERSHLER; KELLER, 2000). A própria hiperglicemia característica da intolerância à glicose tem relação com a síntese imediata de marcadores como a IL-6, com variações nos níveis séricos positivamente relacionados e com aumentos mais significativos na hiperglicemia em pulsos, situação comum no diabético (SOUZA et al., 2008). Chernykh e colaboradores 2014, relataram que a concentração de IL-6 no vítreo de pacientes com deslocamento de retina e retinopatia diabética proliferativa, foi significativamente maior (1,9 vezes), do que o índice de doentes sem sinais de RDP. No entanto, o papel da IL-6 no tecido nervoso é intrigante uma vez que tanto aumenta o dano agudo, aumentando a inflamação neural, quanto fornece neuroproteção, promovendo a expressão de fatores neurotróficos (SUZUKI; TANAKA; SUZUKI, 2009).

3. REFERÊNCIAS

- ABHARY, S.; HEWITT, A. W.; BURDON, K. P.; CRAIG, J. E. A systematic metaanalysis of genetic association studies for diabetic retinopathy. **Diabetes**, n. 58, p. 2137-2147, 2009.
- ADKINS, E. A.; HENDRIX, D. V. H. Outcomes of dogs presented for cataract evaluation: a retrospective study. **JAAHA**, v. 41, p.235-240, 2005.
- AIELLO, L. P. Angiogenic pathways in diabetic retinopathy. **Engl. J. Med**, v.353, n. 8, p. 839-841, 2005.
- ALZAID, A. A. Insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Acta Diabetologica**, v. 33, n. 2, p. 87-99, 1996.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 31, n. 1, p. 55-60, 2008.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes—2014. **Diabetes Care**. v. 37, n.1, p.14-80, 2014.
- ANTONETTI, D. A.; BARBER, A. J.; BRONSON, S. K.; FREEMAN, W. M.; GARDNER, T. W.; JEFFERSON, L. S.; KESTER, M.; KIMBALL, S. R.; KRADY, J. K.; LANOUE, K. F.; NORBURY, C. C.; QUINN, P. G.; SANDIRASEGARANE, L.; SIMPSON, I. A. JDRF Diabetic Retinopathy Center Group. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. **Diabetes**, v. 55, n. 9, p. 2401-2411, 2006.
- ANWAR, M. M.; MEKI, A. R. M. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol**, v. 135, p. 539–547, 2003.
- AOYAMA, T.; PAIK, Y. H.; WATANABE, S.; LALEU, B.; GAGGINI, F.; FIORASO-CARTIER, L.; MOLANGO, S.; HEITZ, F.; MERLOT, C.; SZYNDRALEWIEZ, C.; PAGE, P.; BRENNER, D. A. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (nox) in experimental liver fibrosis: Gkt137831 as a novel potential therapeutic agent. **Hepatology**, v. 56, n. 6, p. 2316-2327, 2012.
- BABA, K.; BENLEULMI-CHAACHOUA, A.; JOURNÉ, A. S.; KAMAL, M.; GUILLAUME, J. L.; DUSSAUD, S.; GBAHOU, F.; YETTOU, K.; LIU, C.; CONTRERAS-ALCANTARA, S.; JOCKERS, R.; TOSINI, G. Heteromeric MT1/MT2 melatonin receptors modulate photoreceptor function. **Sci. Signal**, v. 6, n. 296,p. 89, 2013.
- BAGI, Z.; FEHER, A.; BELEZNAI, T. Preserved coronary arteriolar dilatation in patients with type 2 diabetes mellitus: implications for reactive oxygen species. **Pharmacol Report**. v. 38, n. 61, p. 99-104, 2009.
- BARBER, A. J. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**. v.27, n. 2, p. 283-90, 2003.

1441 BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in
1442 chronic inflammatory diseases. **N .Engl. J. Med**, v. 336, p. 1066–1071, 1997.

1443 BAILEY, C. J. Potential new treatments for type 2 diabetes. **Trends. Pharmacol.**
1444 **Science**. v. 21, p. 259 – 265, 2000.

1445 BAYDAS, G.; ERCEL, E.; CANATAN, H.; DONDER, E.; AKYOL, A. Effect of
1446 melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under Constant
1447 light exposure. **Cell Biochem Funct**, v. 19, p. 37-41, 2001.

1448 BAYDAS, G.; TUZCU, M.; YASAR, A.; BAYDAS, B. Early changes in glial reactivity
1449 and lipid peroxidation in diabetic rat retina: effects of melatonin. **Acta. Diabetol**, v.
1450 41, p. 123–128, 2004.

1451

1452 BAYNES, J. W. Role of Oxidative Stress in Development of Complications in
1453 Diabetes **Diabetes**, v. 40, n. 4, p. 405-412, 1991.

1454 BEARSE, M. A. JR; ADAMS, A. J.; HAN, Y.; SCHNECK, M. E.; NG, J.; BRONSON-
1455 CASTAIN, K.; BAREZ, S. A multifocal electroretinogram model predicting the
1456 development of diabetic retinopathy. **Prog. Retin. Eye Res**, v. 25, n. 5, p. 425–448,
1457 2006.

1458 BERGER, J. A. A two-clock model of circadian timing in the immune system of
1459 mammals. **Pathol. Biol**, v. 56, p. 286-291, 2008.

1460 BENAROUS, R., SASONGKO, M. B., QURESHI, S., FENWICK, E., DIRANI, M.,
1461 WONG, T. Y.; LAMOUREUX, E. L. Differential association of serum lipids with
1462 diabetic retinopathy and diabetic macular edema. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, v.
1463 52, p. 7464-7469, 2011.

1464 BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences,
1465 measurements and dietary influences. **Inter. J. Food. Sci. Nutri**, v. 47, p. 233-261,
1466 1996.

1467 BERNTSON, A.; TAYLOR, W. R. Response characteristics and receptive field widths
1468 of on-bipolar cells in the mouse retina. **J. Physiology**, v. 524, n. 3, p. 879-889, 2000.

1469

1470 BITO, L. Z.; SALVADOR, E. V. PETRINOVIC L .Intraocular fluid dynamics. IV
1471 intraocular sites of solute utilization and transport as revealed by studies on aphakic
1472 eyes. **Exp. Eye. Res**, v. 26, n. 1, p. 47-55, 1978.

1473

1474 BLOODWORTH, J. M. JR. Diabetic retinopathy. **Diabetes**. v.11, p.1–22, 1962.

1475 BOELTER, M. C.; AZEVEDO, M. J.; GROSS, J. L.; LAVINSKY, J. Fatores de risco
1476 para retinopatia diabética. **Arq. Bras. Oftalmol**, v. 66, n. 1, p. 239-247, 2003.

1477 BOSCO, A.; LERÁRIO, A. C.; SORIANO, D.; SANTOS, R. F.; MASSOTE, P.;
1478 GALVÃO, D.; FRANCO, A. C. H. M.; PURISCH, S.; FERREIRA A. R. Retinopatia
1479 Diabética. **Bras. Endocrinol. Metab**, v. 49, n. 2, p. 217-227, 2005.

1480 BOTASSIO, A. A.; YAMASATO, J. M.; MEDEIROS, C. M. Direção veicular em
1481 indivíduos com retinopatia diabética: revisão e reflexão sobre as normas atuais.
1482 **Saúde, Ética & Justiça**, v. 20, n. 1, p. 21-28, 2015.

1483

- BRASIL, O. M.; BRASIL, O. F. M. Análise comparativa da cirurgia do buraco macular associada à remoção da membrana limitante interna com e sem coloração pela indocianina verde. **Arq. Bras. Oftalmol**, v. 69, n. 2, p. 157-160, 2006.
- BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 56, p.1615–25, 2005.
- BRZEZINSKI, A. Melatonin in humans. **N. Engl. J. Med**, v. 336, p. 186–195, 1997.
- BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 56, p.1615–25, 2005.
- BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H.; KJOS, S. L.; WATANABE, R. M. What is gestational diabetes? **Diabetes Care**, v. 30, n. 2, p.105-111, 2007.
- BUONFIGLIO, D. C.; PELICIARI-GARCIA, R. A.; AMARAL, F. G.; PERES, R.; NOGUEIRA, T. C. A.; AFECHÉ, S. C.; CIPOLLA-NETO, J. Early-Stage Retinal Melatonin Synthesis Impairment in Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. **IOVS**, v. 52, n. 10, 2011.
- BURNS, M. E.; MENDEZ, A.; CHEN, J.; BAYLOR, D. A. Dynamics of Cyclic GMP Synthesis in retinal rods. **Neuron**, v. 36, p. 81-91, 2002.
- CAICEDO, A.; ESPINOSA-HEIDMANN, D. G.; PIÑA, Y.; HERNANDEZ, E. P.; COUSINS, S. W. Blood-derived macrophages infiltrate the retina and activate Muller glial cells under experimental choroidal neovascularization. **Exp Eye Res**, v. 81, n.1, p. 38-47, 2005.
- CAPP, C.; ZENNIG, N.; WAJNER, S.; MAIA, A. L. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide. **Rev. HCPA**, v. 29, n. 1, p. 51-59, 2009.
- CHEUNG, N.; MITCHELL, P. WONG, T. Y. Diabetic retinopathy. **Lancet**, n. 376, p. 124-136, 2010.
- CHERNYKH, V.; SMIRNOV, E.; VARVARINSKY, Y.; CHERNYKH, D.; OBUKHOVA, O.; TRUNOV, A. IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A and vascular endothelial growth factor in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v. 5, p. 184-187, 2014.
- CIPOLLA-NETO, J.; AFECHÉ, S. C.; Glândula pineal in: Aires, M.M (Ed.). *Fisiologia*. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. p. 981-990.
- CLERMONT, A. C.; AIELLO, L. P.; AIELLO, L. M.; SCHLOSSMAN, D.; KOPPLE, A.; KING, G. L.; BURCELL, S. E. Vitamin E normalized retinal blood flow in diabetic patients with minimal diabetic retinopathy: results of a double masked crossover clinical trial (Abstract). **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, v. 39, n. 4, p. 1000, 1998.
- CORMACK, D. H. **Fundamentos de histologia**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p.90-93, 1996.
- COSTA, R. A.; JORGE, R.; CALUCCI, D.; MELO, L. A. JR.; CARDILLO, J. A.; SCOTT, I. U. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for central and hemicentral retinal vein occlusions: IBeVO study. **Retina**, v. 27, n. 2, p. 141–149, 2007.

1530 CREAGER, M. A.; LUSCHER, T. F.; COSENTINO, F.; BECKMAN, J. A. Diabetes
1531 and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy:
1532 part **Circulation**, v.108, p. 1527–1532, 2003.

1533 CULLEN, C. R.; GRAHN, B. H. Diagnostic Ophthalmology. **Can. J. Vet**, v. 43, p.
1534 729-730, 2002.

1535 DJAMGOZ, M. B.; HANKINS, M. W.; HIRANO, J.; ARCHER, S. N. Neurobiology of
1536 retinal dopamine in relation to degenerative states of the tissue. **Vision. Res**, v. 37,
1537 p. 3509–3529, 1997.

1538

1539 DANAIE, G.; FINUCANE, M. M.; LU, Y.; SINGH, G. M.; COWAN, M. J.; PACIOREK,
1540 C. J.; LIN, J. K.; FARZADFAR, F.; KHANG, Y. H.; STEVENS, G. A.; RAO, M.; ALI, M.
1541 K.; RILEY, I. M.; ROBINSON, C. A.; EZZATI, M. National, regional, and global trends
1542 in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis
1543 of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years
1544 and 2_7 million participants. **The lancet**, v. 378, p. 31-40, 2011.

1545 DANTA, A. M.; COSTA, J. G. C. DADOS HISTOFISIOLOGICOS IN: DANTA, A. M.;
1546 COSTA, J. G. C.; NETO, L. P.; YAMANE ,R.; ELIAS, C. A.; Eletrofisiologia ocular.
1547 1.ed. Editora cultura médica, p 1-55, 1995.

1548

1549 DAS. A.V.; PADAYUTTI, P. S.; PAULOSE, C. S. Effect of leaf extract of Aegle
1550 marmelose (L) Corra ex Roxb. On histological and ultrastructural changes in tissues
1551 of streptozotocin induced diabetic rats. **Indian J Exp Biol**, v.14, p. 341-344, 1996.

1552 DAWSON, N. S.; ZAWIEJA, D. C.; WU, M. H.; GRANGER, H. J. Signaling pathways
1553 mediating VEGF165-induced calcium transients and membrane depolarization in
1554 human endothelial cells. **Faseb. J**, v. 20, n. 7, p. 991-993, 2006.

1555 DERLACZ, R. A.; POPLAWSKI, P.; NAPIERALA, M.; JAGIELSKI, A. K.; BRYLA, J.
1556 Melatonin-induced modulation of glucose metabolism in primary cultures of rabbit
1557 kidney-cortex tubules. **J. Pineal. Res**, v. 38, p. 164–169, 2005.

1558 DJAMGOZ, M. B.; HANKINS, M. W.; HIRANO, J.; ARCHER, S. N. Neurobiology of
1559 retinal dopamine in relation to degenerative states of the tissue. **Vision. Res**, v. 37,
1560 p. 3509–3529, 1997.

1561

1562 DIRANI, M.; XIE, J.; FENWICK, E.; BENAROUS, R.; REES, G.; WONG, T. Y;
1563 LAMOUREUX, E. L. Are obesity and anthropometry risk factors for diabetic
1564 retinopathy? The diabetes management project. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, v. 52,
1565 p. 4416-4421, 2011.

1566 DIBNER, C.; SCHIBLER, U.; ALBRECHT, U. The mammalian circadian timing
1567 system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. **Ann. Rev.**
1568 **Physio**, v. 72, p. 517-549, 2010.

1569 DINCER, Y. A. T.; ALADEMIR, Z.; ILKOVA, H. Effect of oxidative stress on
1570 glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes
1571 mellitus. **Metabolism**, v. 51, n. 10. p. 1360-1362, 2002.

1572 DVORAK, H. F.; BROWN, L. F.; DETMAR, M.; DVORAK, A. M. Vascular
1573 permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular

hyperpermeability, and angiogenesis. **Am. J. Pathol**, v.146, n. 5, p. 1029-1039, 1995.

DONG, X.; SWAMINATHAN, S.; BACHMAN, L. A.; CROATT, A. J.; NATH, K. A.; GRIFFIN, M. D. "Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemiareperfusion injury," **Kidney Inter**, v. 71, n. 7, p. 619–628, 2007.

DUBOCOVICH, M. L.; MASANA, M. I.; IACOB, S.; SAURI, D. M. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel 1a and Mel 1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, v. 355, n. 3, p. 365-375, 1997.

ELNER, S. G.; ELNER, V. M.; BIAN, Z. M.; LUKACS, N. W.; KURTZ, R. M.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. Human retinal pigment epithelial cell interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 modulation by T-lymphocyte products," **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, v. 38, n. 2, p. 446–455, 1997.

EVANS, J. L.; GOLDFINE, I. D.; MADDUX, B. A.; GRODSKY, G. M. Are Oxidative Stress-Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and-Cell Dysfunction? **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2003.

EVANS, J. L.; GOLDFINE, I. D. α-Lipoic acid: a multi-functional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. **Diabetes. Technol. Ther**, v. 2, p. 401–413, 2000.

ERSHLER, W. B.; KELLER, E. T. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. **Annu. Rev. Med**, v. 51, p. 245-70, 2000.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES (IDF) acesso em : 16/10/11

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr Rev**, v.18, n. 1, p. 4-25, 1997.

FERRARA N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocr. Rev**, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.

FRANCO. R.; SCHONEVELD, O. P.; PAPPA, A.; PANAYIOTIDIS, M. I. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. **Arch. Physiol. Biochem**, v. 113, p. 234-258, 2007.

FUNATSU, H.; YAMASHITA, H.; NOMA, H.; MIMURA, T.; YAMASHITA, T.; HORI, S. Increased levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the aqueous humor of diabetics with macular edema. **Am. J. Ophthalmol**, v.133, n. 1, p.70-77, 2002.

GARDNER, T. W.; LIETH, E.; KHIN, S. A.; BARBER, A. J.; BONSALE, D. J.; LESHER, T.; RICE, K.; BRENNAN, W. A. Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, v. 38, n. 11, p. 2423-2427, 1997.

GARDNER, T. W.; ANTONETTI, D. A.; BARBER, A. J.; LANOUE, K. F.; LEVISON, S.W. Diabetic retinopathy: more than meets the eye. **Surv. Ophthalmol**, v. 47, n. 2, p. 253-262, 2002.

1619 GARIANO, R. F.; GARDNER, T. W. Retinal angiogenesis in development and
1620 disease. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 960-966, 2005.

1621 GARTNER, Leslie P; HIATT, James L. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro:
1622 editora Guanabara koogan, 1997. 400-405p.

1623 GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ.**
1624 **Res**, 29; v.107, n. 9, p. 1058–1070, 2010.

1625

1626 GOLOGORSKY, D.; THANOS, A.; VAVVAS, D. Therapeutic Interventions against
1627 Inflammatory and Angiogenic Mediators in Proliferative Diabetic Retinopathy. **Med.**
1628 **Inflam**, v. 2012, p.10, 2012.

1629

1630 GOMES, M. A. M.; NETO, N. C. M.; BISPO, I. G. A. Interleucina-6, Moléculas de
1631 Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão
1632 de Literatura. **SOCERJ**, v. 22, n. 6, p. 398-403, 2009.

1633 GOTTLIEB, M. G. V.; SCHWANKE, C. H. A.; BODANESE, L. C.; CRUZ, I. B. M.
1634 Status antioxidante, diabetes mellitus ii e aterosclerose. **Rev. Saúde. Pesq**, v. 2, n.
1635 1, p. 99-106, 2009.

1636 GUALTIERI, M. Visão de cores e sensibilidade ao contraste em indivíduos com
1637 diabetes melito: avaliação psicofísica e eletrofisiológica. Dissertação de mestrado,
1638 instituto psicologia, Universidade de São Paulo, 153f, São Paulo, 2004.

1639 GUALTIERI, V.; AUFFRETI, A.; MATTSON, M. P.; MARIANI, j.; GARABEDIAN, B.
1640 V. A new and simple approach for genotyping Alzheimer`s disease presenilin-1
1641 mutant knockin mice. **J. neurosci. methods**, v. 181, n. 2, p. 235-240, 2009.

1642 GUIMARÃES HC, GERENUTTI M. Alternativas terapêuticas para o tratamento da
1643 degeneração macular relacionada à idade: um desafio para a saúde pública. **Rev.**
1644 **Ciênc. Farm. Básica. Apl**, v. 34, n. 4, p. 459-468, 2013.

1645 GUM, G.G. Electrophysiology in veterinary ophthalmology. **Vet. Clin. North Amer.**
1646 **Small. Ani. Pract**, v.10, p.437-454, 1980.

1647 GO, A. S.; MOZAFFARIAN, D.; ROGER, V. L.; BENJAMIN, E. J.; BERRY, J.
1648 D.;BLAHA, M. J.; DAI, S.; FORD, E. S.; FOX, C. S.; FRANCO, S.; FULLERTON, H.
1649 J.;GILLESPIE, C.; HAILPERN, S. M.; HEIT, J. A.; HOWARD, V. J.; HUFFMAN, M.
1650 D.; JUDD, S. E.; KISSELA, B. M.; KITTNER, S. J.; LACKLAND, D. T.; LICHTMAN, J.
1651 H.; LISABETH, L. D.; MACKEY, R. H.; MAGID, D. J.; MARCUS, G. M.; MARRELI, A.;
1652 MATCHAR, D. B.; MCGUIRE, D. K.; MOHLER, E. R.; MOY, C. S.; MUSSOLINO, M.
1653 E.; NEUMAR, R. W.; NICHOL, G.; PANDEY, D. K.; PAYNTER, N. P.; REEVES, M.
1654 J.; SORLIE, P. D.; STEIN, J.; TOWFIGH, A.; TURAN, T. N.; VIRANI, S. S.; WON, N.
1655 W.; WOOD, D.; TURNER, M. B. American Heart Association Statistics Committee
1656 and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2013
1657 update: a report from the American Heart association. **Circulation**. v. 127, p. 143-
1658 152, 2013.

1659 GRACE, M. S.; CHIBA, A.; MENAKER, M. Circadian control of photoreceptor outer
1660 segment membrane turnover in mice genetically incapable of melatonin synthesis.
1661 **Vis. Neurosci**, v. 16, p. 909–918, 1999.

- 1662 GREENSTEIN, V. C.; CHEN, H.; HOOD, D. C.; HOLOPIGIAN, K.; SEIPLE, W.;
1663 CARR, R. E. Retinal function in diabetic macular edema after focal laser
1664 photocoagulation. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, v. 41, p.3655–3664, 2000.
- 1665
1666 GROSSO, A.; CHEUNG, N.; VEGLIO, F.; WONG, T. Y. Similarities and differences in
1667 early retinal phenotypes in hypertension and diabetes. **J. Hypertens**, n. 29, p .1667-
1668 1675, 2011.
- 1669
1670 GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P.; CAMARGO, J. L.; REICHEL, A. J.; AZEVEDO, M.
1671 J. Diabetes Melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arq.**
1672 **Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 46, n. 1, p. 16 – 26, 2002.
- 1673 GU, P.; HARWOOD, L. J.; ZHANG, X.; WYLIE, M.; CURRY, W. J.; COGLIATI, T.
1674 Isolation of retinal progenitor and stem cells from the porcine eye. **Mol. Vis**, v. 13, p.
1675 1045-1057, 2007.
- 1676 HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* v. 35, n. 5, p.
1677 1147-1150, 2007.
- 1678 HARDELAND, R.; CARDINALI, D. P.; SRINIVASAN, V.; SPENCE, D. W.; BROWN,
1679 G. M.; PANDI-PERUMAL, S. R. Melatonin –A pleiotropic, orchestrating regulator
1680 molecule. **Prog. in neurobiol**, v. 93, n. 3, p. 350-384, 2011.
- 1681 HAMILTON, S. J.; CHEW, G. T.; WATTS, G. F. Therapeutic regulation of endothelial
1682 dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Diab. Vasc. Dis. Res*, v. 4, p. 89-102, 2007.
- 1683 HECKENLIVELY, J. R. ARDEN, G. B. Principles and Practice of Clinical
1684 Electrophysiology of Vision. 2.ed. Massachusetts: MIT, 2006.
- 1685 HIRIART, B. M.; et al. hormona de la oscuridad. **Rev. Lat. amer patol**, v. 59, n. 4, p.
1686 222-232, 2012.
- 1687 HO, F. M.; LIU, S. H.; LIAU, C. S.; HUANG, P. J.; LIN-SHIAU, S. Y. High glucose-
1688 induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of
1689 c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. **Circulation**, v. 101, p. 2618–2624,
1690 2000.
- 1691 HOUNSOM, L.; CORDER, R.; PATEL, J.; TOMLINSON, D. R. Oxidative stress
1692 participates in the breakdown of neuronal phenotype in experimental diabetic
1693 neuropathy. **Diabetologia**, v. 44, p. 424–428, 2001.
- 1694 ISHIDA S, USUI T, YAMASHIRO K, KAJI, Y.; ABMED, E.; CARRASQUILLO, K. G.;
1695 AMANO, S.; HIDA, T.; OGUCHI, Y.; ADAMIS, A. P. VEGF164 is proinflammatory in
1696 the diabetic retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, n. 5, p. 2155–2162, 2003.
- 1697 JARRETT, S. G.; LIN, H.; GODLEY, B. F.; BOULTON, M. E. “Mitochondrial DNA
1698 damage and its potential role in retinal degeneration,” **Prog. Retin. Eye. Res**, v. 27,
1699 n. 6, p. 596–607, 2008.
- 1700 JAIN, S. K.; LEVINE, S. C. Effect of diabetes on red blood cell membrane lipid
1701 peroxidation in rats. *Clin. Res*, v. 38, p. 16, 1990.
- 1702 JIANG, J. X.; CHEN, X.; SERIZAWA, N.; SZYNDRALEWICZ, C.; PAGE, P.;
1703 SCHRODER, K.; BRANDES, R. P.; DEVARAJ, S.; TOROK, N. J. Liver fibrosis and

1704 hepatocyte apoptosis are attenuated by gkt137831, a novel nox4/nox1 inhibitor in
1705 vivo. **Free. Radic. Biol. Med**, v. 53, n. 2, p. 289-296, 2012.

1706 JOSELEVITCH, C. Human retinal circuitry and physiology. **Psychology &**
1707 **neuroscience**, v. 1, n. 2, p. 141-165, 2008.

1708

1709 JONAS, J. B.; DICHTL, A. Evaluation of the retinal nerve fiber layer. **Surv.**
1710 **Ophthalmol.** v.40, n. 5, p. 369–78, 1996.

1711

1712 JOUSSEN, A. M.; MURATA, T.; TSUJIKAWA, A.; KIRCHHOF, B.; BURSELL, S. E.;
1713 ADAMIS, A. P. Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic
1714 retina. **Am. J. Pathol**, v. 158, n. 1, p.147-152, 2001.

1715 KAHN, C. R. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes.
1716 **Diabetes**, v. 43, p.1066 – 1084, 1994.

1717 KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Sounding the alarm: protein kinase cascades
1718 activated by stress and inflammation. **J. Biol. Chem**, v. 271, p. 24313–24316, 1996.

1719

1720 KAUR, C.; SIVAKUMAR, V.; YONG, Z.; LU, J.; FOULDS, W. S.; LING, E. A. Blood-
1721 retinal barrier disruption and ultrastructural changes in the hypoxic retina in adult rats:
1722 the beneficial effect of melatonin administration. **J. Pathol**, v. 212, p. 429–439, 2007.

1723

1724 KAUR, C.; FOULDS, W. S.; LING, E. A. “Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic
1725 conditions: basic concepts, clinical features and management,” **Prog. Ret. Eye Res**,
1726 v. 27, n. 6, p. 622–647, 2008.

1727 KHAN, Z. A.; CHAKRABARTI, S. Cellular signaling and potential new treatment
1728 targets in diabetic retinopathy. **Exp. Diabetes Res**, v. 2007, p. 31867, 2007.

1729 KHODJAEV, N. S.; CHERNYKH, V. V.; ROMENSKAYA, I.V.; KUNTYSHEVA, K.E.;
1730 TRUNOV, A. N. (2011) Effect of la-ser coagulation retina on clinical-laboratory
1731 parameters in patients diabetic macular edema. Bulletin of the Novosi-birsk State
1732 University, **9**, p. 48-53.

1733

1734 KOMAROMY, A. M.; SMITH, P. J.; BROOKS, D. E. Electroretinography in dogs and
1735 cats. Part II. Technique, interpretation and indications. **Comp. Cont. Edu**, v. 20, p.
1736 355-366, 1998.

1737 KOWLURU, R. A.; CHAN, P. S.; “Oxidative stress and diabetic retinopathy,” **Expert.**
1738 **Diabetes**, v. 2007, p. 12, 2007.

1739 KOWLURU, R. A.; KENNEDY, A. Therapeutic potential of anti-oxidants and diabetic
1740 retinopathy. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, v. 10, p. 1665–1676, 2001.

1741 KOWLURU, R. A.; TANG, J.; TIMOTHY S. KERN, T. S. Abnormalities of Retinal
1742 Metabolism in Diabetes and Experimental Galactosemia VII. Effect of long-term
1743 administration of antioxidants on the development of retinopathy. **Diabetes**, v. 50, n.
1744 8, p. 1938-1942, 2001.

1745 KOWLURU, R. A.; ODENBACH, S. Role of interleukin-1beta in the development of
1746 retinopathy in rats: effect of antioxidants. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, v. 45, n. 11,
1747 p. 4161-4166, 2004.

1748 KOLLIAS, A. N.; ULBIG, M. W. Diabetic retinopathy: Early diagnosis and effective
1749 treatment. **Dtsch. Arztebe.** Int. v. 107, n. 5, p. 75-83, 2010.

1750 KOLB, H.; FERNANDEZ, E.; NELSON, R.; JONES, B. (2011). Webvision: the
1751 organization of the retina and visual system. Salt Lake City (UT): University of Utah
1752 Health Sciences Center. Acedido em Ago. 15, 2012, em:
1753 <http://webvision.med.utah.edu/>.

1754 KRADY, J. K.; BASU, A.; ALLEN, C. M.; XU, Y.; LANOUE, K. F.; GARDNER, T. W.;
1755 LEVISON, S. W. Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression,
1756 microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic
1757 retinopathy. **Diabetes**, v.54, n. 5, p. 1559-1565, 2005.

1758 KUSARI, j.; ZHOU, S. X.; PADILLO, E.; CLARKE, K. G.; GIL, D. W. Inhibition of
1759 Vitreoretinal VEGF Elevation and Blood– Retinal Barrier Breakdown in
1760 Streptozotocin-Induced Diabetic Rats by Brimonidine. **Invest. Ophthalmol Visual.**
1761 **Science**, v. 51, n. 2, 2010.

1762 LAMB, T. D.; PUGH, J. R. E. N. Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin
1763 regeneration-the proctor lecture. **Invest. Ophthalmol. Visual. science**, v. 47, n. 12,
1764 p. 5138-5152, 2006.

1765 LA FLEUR, S. E.; KLASBEEK, A.; WORTEL, J.; BUIJS, R. A.; Suprachiasmatic
1766 nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. **Neuroendocrinology**, v.
1767 11, n.8 p. 643-652, 1999.

1768 LA FLEUR, S. E.; KLASBLEK, A.; WORTEL, J.; FEKKS, M. L.; BUIJS, S. R. A daily
1769 rhythm in glucose tolerance. A role for the suprachiasmatic nucleus. **Diabetes**, v.
1770 50, n.6, p. 1237-1243, 2001.

1771 LENT, R. cem bilhões de neurônios ? conceitos fundamentais de neurociências. 2
1772 ed. Sao Paulo : Atheneu, 2010.
1773

1774 LEE, E. J.; LEE, M. Y.; CHEN, H. Y.; HSU, Y. S.; WU, T. S.; CHEN, S. T.; CHANG,
1775 G. L. Melatonin attenuates gray and white matter damage in a mouse model of
1776 transient focal cerebral ischemia. **J. Pineal. Res**, v.38, p. 42–52, 2005.

1777 LALEU, B.; GAGGINI, F.; ORCHARD, M.; FIORASO-CARTIER, L.; CAGNON, L.;
1778 HOUNGNINOU-MOLANGO, S.; GRADIA, A.; DUBOUX, G.; MERLOT, C.; HEITZ, F.;
1779 SZYNDRALEWIEZ, C.; PAGE, P. First in class, potent, and orally bioavailable nadph
1780 oxidase isoform 4 (nox4) inhibitors for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis.
1781 **J. Med. Chem**, v. 53, p. 7715-7730, 2010.

1782 LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Rev. Bras.**
1783 **Nutr. Clin**, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.

1784 LEON, J.; ACUNA-CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G.; TAN, D. X.; REITER, R. J.
1785 Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. **J. Pineal. Res**, v. 38, p. 1–9, 2005.

1786 LERNER, A. B. et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens
1787 melanocytes. **J. Am. Chem. Soc**, v. 80, p. 2587, 1958.

1788 LIETH, E.; LANOUE, K. F.; BERKICH, D. A.; XU, B.; RATZ, M.; TAYLOR, C.;
1789 HUTSON, S. M. Nitrogen shuttling between neurons and glial cells during glutamate
1790 synthesis. **J. Neurochem**, v. 76, n. 6, p. 1712-1723, 2001.
1791

1792 LI, X.; SUN, X.; HU, Y.; HUANG, J. ZHANG, H. Electroretinographic oscillatory
1793 potentials in diabetic retinopathy. **Doc. Ophthalmol**, v. 81, p. 173-179, 1992.

1794 LI, X.; ZHANG, M.; TANG, W. Effects of Melatonin on Streptozotocin-Induced Retina
1795 Neuronal Apoptosis in High Blood Glucose Rat. **Neurochem. Res**, v. 38, p. 669–
1796 676, 2013.

1797 LIM, L. S.; TAI, E. S.; MITCHELL, P.; WANG, J. J.; TAY, W. T.; LAMOUREUX, E.;
1798 WONG, T. Y. C-reactiveprotein, body mass index, and diabetic retinopathy. **Invest.**
1799 **Ophthalmol. Vis. Sci**, v. 51, p. 4458-4463, 2010.

1800 LIMA, F. B.; MACHADO, V. F.; BARTOL, I.; SERAPHIN, P. M.; SUMIDA, D. H.;
1801 MORAIS, S. M.; HELL, N. S.; OKAMOTO, M. M.; SAAD, M. J. A.; CARVALHO, C. R.
1802 O.; CIPOLLA-NETO, J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decrease
1803 adipose cell responsiveness to insulin in rats. **Am. J. Physiol**, v. 275, n. 6, p. 934-
1804 941, 1998.

1805 LOVESTAM-ADRIAN, M.; AGARDH, C. D.; TORFFVIT, O. The temporal
1806 development of retinopathy and nephropathy in type 1 diabetes mellitus during 15
1807 years diabetes duration. **Diabetes. Res. Clin. Pract**, v.45, p. 15-23, 1999.

1808 LOPES, J. P.; OLIVEIRA, S. M.; FORTUNATO, J. S. Stress oxidativo e seus efeitos
1809 na insulino-resistência e disfunção das células β -pancreáticas - Relação com as
1810 complicações da diabetes Mellitus tipo 2. **Acta Médica Portuguesa**, v. 21, n. 3, p.
1811 293-302, 2008.

1812 LUO, M.; MEI-LING, A. Joiner stress response signaling pathways may lead to
1813 mitochondrial biogenesis. **Diabetes**, v. 63, p.1831–1832, 2014.

1814 LUVONE, P. M.; TOSINI, G.; POZDEYEV, N.; HAQUE, R.; KLEIN, D. C.;
1815 CHAURASIA, S. S. Circadian clocks, clock-controlled genes and melatonin
1816 biosynthesis in the retina. **Prog Ret Eye Res**, v. 24, p. 433–456, 2005.

1817 MAGANHIN, C. C.; CARBONEL, A. A. F.; HATTY, J.H.; FUCHS, L. F. P.; OLIVEIRA-
1818 JÚNIOR, I. S.; SIMÕES, M. J.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, E. C.; SOARES JR, J. M.
1819 Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Rev Assoc Med**
1820 **Bras**, v. 54, n. 3 p. 267-271, 2008.

1821 MADSEN-BOUTERSE, S. A.; KOWLURU, R. A. “Oxidative stress and diabetic
1822 retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives,” **Reviews**
1823 **in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 9, n. 4, p. 315–327, 2008.

1824 MADDUX, B. A.; SEE, W.; LAWRENCE, J. C. JR.; GOLDFINE, A. L.; GOLDFINE, I.
1825 D.; EVANS, J. L. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat
1826 L6 muscle cells by micromolar concentrations of α -lipoic acid. **Diabetes**, v. 50, p.
1827 404–410, 2001.

1828 MANDRUP-POULSEN, P. Interleukin-1 Antagonism: A Sturdy Companion for
1829 Immune Tolerance Induction in Type 1 Diabetes? **Diabetes**, v. 63, p.1833–1835,
1830 2014.

1831 MARKUS, R. P.; JUNIOR, E. J. M. B.; FERREIRA, Z. S. Ritmos biológicos:
1832 entendendo as horas, os dias e as estações do ano. **Einstein**, v. 1, p. 143-148,
1833 2003.

1834 MARMOR, M. F.; HOOD, D. C.; KEATING, D.; KOND, M.; SEELIGER, M. W.;
1835 MIYAKE, Y. Guidelines for basic Multifocal Electroretinography (mfERG). *Doc.*
1836 *Ophthalmol*, v. 106, p. 105-115, 2003.

1837 MARMOR, M. F.; HOLDER, G. E.; SEELIGER, M. W.; YAMAMOTO, S. Standard for
1838 clinical electroretinography (2004 update). **Doc. Ophthalmol**, v. 108; p. 107-114,
1839 2004.

1840 MARMOR, M. F.; HOLDER, G. E.; SEELIGER, M. W.; YAMAMOTO, S. Standard
1841 for clinical electroretinography (2004 update). **Doc. Ophthalmol**, v.108, p. 107-114,
1842 2008.

1843 MARMOR, M. F.; FULTON, A. B.; HOLDER, G. E.; MIYAKE, Y.; BRIGELL, M.; BACH,
1844 M. Iscev. standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). **doc**
1845 **ophthalmol**, v.118, p. 69-77, 2009.

1846

1847 MARTINEZ-RIQUELME, A. E.; ALLISON, S. P. Insulin revisited. **Clinical. Nutrition**,
1848 v. 22, p. 7 -15, 2003.

1849

1850 MASLAND, R. H. The fundamental plan of the retina. **Nat. Neurosci**, v. 4, n. 9, p.
1851 877-86, 2001.

1852 MEDINA, N. H.; MUÑOZ, E. H.; Atenção à saúde ocular da pessoa idosa. **Bepa**, v.8,
1853 n. 85, p. 23-28, 2011.

1854 MEHMET, G.; SINAN, E.; MUKADDES, E.; NIGAR, V. Protective Effects of
1855 Melatonin and Aminoguanidine on the Cornea in Streptozotocin-induced Diabetic
1856 Rats. **Cornea**, v. 27, n. 7, p. 795-801, 2008.

1857 MICHAELSON I. The mode of development of the vascular system of the retina with
1858 some observations on its significance for certain retinal disorders. **Trans.**
1859 **Ophthalmol. Soc. UK**, v. 68, p. 137-80, 1948.

1860 MOHAMED, A. K.; BIERHAUS, A.; SCHIEKOFER, S.; TRITSCHLER, H.; ZIEGLER,
1861 R.; NAWROTH, P. P: The role of oxidative stress and NF- κ B activation in late
1862 diabetic complications. **Biofactors**, v. 10, p. 157–167, 1999.

1863

1864 MOLLER, D. E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome.
1865 **Nature**, v. 414, p. 821 – 827, 2001.

1866

1867 MONTEIRO, M. B. C. A. Dissertação (Mestrado)-Universidade de São Paulo-
1868 Faculdade de Medicina, Programa de Endocrinologia, São Paulo, BR-SP, 2012

1869 MOURA, I. P.; GOMES, R. J.; LEME, J. A.; VOLTARELLI, F. A.; RIBEIRO, C.;
1870 MOURA, R. F.; ARAÚJO, M. B.; LUCIANO, E.; MELLO, M. R. Insulina pancreática
1871 de ratos diabéticos tipo 1 submetidos a um protocolo de treinamento físico
1872 individualizado. **Motricidade**, v. 8, n. 1, p. 23-32, 2012.

1873 NAGY, J. A.; BENJAMIN, L.; ZENG, H.; DVORAL, A. M.; DVORAK, H. F. Vascular
1874 permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. **Angiogenesis**, v.11, n.
1875 2, p.109-119, 2008.

1876 NARFSTRÖM, K.; EKESTEN, B.; ROSOLEN, S. G.; SPIESS, B. M.; PERCICOT, C.
 1877 L.; OFRI, R. Guidelines for clinical electroretinography in the dog. **Doc. Ophthalmol**,
 1878 v. 105, p. 83-92, 2002.

1879 NATARAJAN, R.; SCOTT, S.; BAI, W.; YERNENI, K. K. V.; NADLER, J. Angiotensin
 1880 II signaling in vascular smooth muscle cells under high glucose conditions.
 1881 **Hypertension**, v. 33, p. 378–384, 1999.

1882
 1883 NEWMAN, E. A. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission.
 1884 **Trends. Neurosci**, v. 26, n. 10, p. 536-542, 2003.

1885 NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; DU, X. L.; YAMAGISHI, S.; MATSUMURA, T.;
 1886 KANEDA, Y.; YOREK, M. A.; BEEBE, D.; OATES, P. J.; HAMMES, H. P.;
 1887 GIARDINO, I.; BROWNLEE, M. Normalizing mitochondrial superoxide production
 1888 blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v.404, p. 787–790, 2000.

1889
 1890 NISHIDA, S. Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes
 1891 mellitus. **Endocrine**, v. 27, p. 131–136, 2005.

1892
 1893 NOGUEIRA, F. J.; CASAGRANDE, C. G.; RODRIGUES, C. R. B. S.; BRAGA, H. A.
 1894 C. Aplicação dos diodos emissores de luz orientada a sistemas de iluminação
 1895 pública. **CES/JF**, v. 27 n.1, p. 31-49, 2013.

1896
 1897 NUSINOWITZ, S.; HECKENLIVELY, J. R. Evaluating retinal function in the mouse
 1898 retina with the electroretinogram in: heckenlively . j.r. arden, g.a. principles and
 1899 practice of the electrophysiology of vision. 2ed. Cambridge: the MIT press p. 899-
 1900 909, 2006.

1901 OBROSOVA, I. G.; FATHALLAH, L.; GREENE, D. A. Early changes in lipid
 1902 peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: effect of DL-alpha-lipoic
 1903 acid. **Eur. J. Pharmacol**, v. 398, p. 139-146, 2000.

1904 OSBORNE, N. N.; NASH, M. S.; WOOD, J. P. Melatonin counteracts ischemia-
 1905 induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. **Invest Ophthalmol Vis.**
 1906 **Sci**, v. 12. n. 12, p. 2374-2383, 1998.

1907 OZGUNER, F.; BARDAK, Y.; COMLEKCI, S. Protective effects of melatonin and
 1908 caffeic acid phenethyl ester against retinal oxidative stress in long-term use of mobile
 1909 phone: A comparative study. **Mol. Cell. Biochem**, v. 282, p. 83–88, 2006.

1910 OZAWA, Y.; KURIHARA, T.; SASAKI, M.; BAN, N.; YUKI, K.; KUBOTA, S.;
 1911 TSUBOTA, K. Neural Degeneration in the Retina of the Streptozotocin-Induced Type
 1912 1 Diabetes Model Experimental. **Diab. Res**, v. 2011, p. 1-7.

1913 PACKER, L.; RÖSEN, P.; TRITSCHLER, H. J.; KING, G. L.; AZZI, A. Antioxidants
 1914 in diabetes management. New York, Marcel Dekker; 2000.

1915 PALMOWSKI, A. M.; SUTTER, E. E.; BEARSE JR, M. A.; FUNG, W. Mapping of
 1916 Retinal Function in Diabetic Retinopathy Using the Multifocal Electroretinogram.
 1917 **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, v. 38, n. 12, p. 2586-2596, 1997.

1918 PANDI-PERUMAL, S. R.; TRAKHT, I.; SRINIVASAN, V.; SPENCE, D. W.;
 1919 MAESTRONI, G. J.; ZISAPEL, N.; CARDINALI, D. P. Physiological effects of 82
 1920 melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. **Prog.**
 1921 **Neurobiol**, v. 85, p. 335-353, 2008.

- 1922 PANDI-PERUMAL, S. R.; SRINIVASAN, V.; MAESTRONI, G. J.; CARDINALI, D. P.;
1923 POEGGELER, B.; HARDELAND, R. Melatonin: Nature's most versatile biological
1924 signal? **FEBS. J.** v. 273, v. 13, p. 2813-2838, 2006.
- 1925 PAQUES, M.; TADAYONI, R.; SERCOMBE, R.; LAURENT, P.; GENEVOIS, O.;
1926 GAUDRIC, A.; VICAUT, E. Structural and hemodynamic analysis of the mouse retinal
1927 microcirculation. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** v. 44, p. 4960–4967, 2003.
1928
- 1929 PESCHKE, E.; STUMPF, I.; BAZWINSKY, I.; LITVAK, L.; DRALLE, H.;
1930 MUHLBAUER, H. Melatonin and types 2 diabetes- a possible link?, **J. Pineal. Res.**,
1931 v. 42, n.4, p. 350-358, 2007.
- 1932 PETERSEN-JONES, S.; TUNTIVANICH, N.; MONTIANI-FERREIRA, F.; KHAN, N.
1933 Electroretinograms of dog and chicken. In: HECKENLIVELY, J.R and ARDEN, G.B.
1934 Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision. 2.ed. Massachusetts:
1935 MIT, p.911-921, 2006.
- 1936 PICINATO, M. C.; HABER, E. P.; CARPINELLI, A. R.; CIPOLLA-NETO, J. Daily
1937 rhythm of glucose induced insulin secretion by isolated islets from intact and
1938 pinealectomized rats. **J. Pineal. Res.** v. 33, n. 3, p. 172-177, 2002.
- 1939 PINHEIRO, L. S.; MELO, A. D.; ANDREAZZI, A. E.; CAIRES JÚNIOR, L. C.;
1940 COSTA, M. B.; GARCIA, R. M. G.; Protocol of insulin therapy for streptozotocin-
1941 diabetic rats based on a study of food ingestion and glycemic variation. **Scand. J.**
1942 **Lab. Anim. Sci.** v. 38 n. 2, 2011.
- 1943 POITOUT, V.; ROBERTSON, R. P. Minireview: secondary beta-cell failure in type 2
1944 diabetes—a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. **Endocrinology**, v. 143, p.
1945 339–342, 2002.
- 1946 PONTES, G. N.; Cardoso, E. C.; Carneiro-Sampaio, M. M.; Markus, R. P. Injury
1947 switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine
1948 (phagocytes)- melatonin human colostrums and colostrums phagocytes. **J. Pineal.**
1949 **Res.** v. 41, n. 2, p. 136-141, 2006.
- 1950 PURVES, T.; MIDDLEMAS, A.; AGTHONG, S.; JUDE, E.B.; BOULTON, A. J.;
1951 FERNYHOUGH, P.; TOMLINSON, D. R. A role for mitogen-activated protein kinases
1952 in the etiology of diabetic neuropathy. **Faseb. J.** v. 15, p. 2508–2514, 2001.
- 1953 RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Farmacologia. 5^a ed.
1954 Editora Elsevier, Rio de Janeiro, p. 904, 2004.
- 1955 RANGASAMY, S.; MCGUIRE, P. G.; DAS, A. “Diabetic retinopathy and inflammation:
1956 novel therapeutic targets,” Middle East African. **J. Ophthalmol**, v. 19, n.1, p. 52–59,
1957 2012.
- 1958 REITER, R. J. The mammalian pineal gland: structure and function. **Am. Journal**
1959 **Anat.** v. 162, n. 4, p. 287-313, 1981.

- 1960 REITER, R. J.; ACUNA-CASTROVIEJO, D.; TAN, D. X.; BURKHARDT, S. Free
1961 radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of
1962 melatonin in the central nervous system. *Ann. NY. Acad. Sci.*, v. 939, p. 200-215,
1963 2001.
- 1964 REITER, R. J.; TAN, D. X.; CABRERA, J.; D' ARPA, D.; SAINZ, R. M.; MAYO, J. C.;
1965 RAMOS, S. The oxidant/antioxidant network role of melatonin. *Biol. Signals Recep.*,
1966 v. 8, p.56-63, 1999.
- 1967 REITER, R. J.; TAN, D. X.; OSUNA, C.; GITTO, E. Actions of melatonin in the
1968 reduction of oxidative stress: a review. *J. Biomed. Res.*, v. 7, p. 444–458, 2000.
1969
- 1970 REITER, R. J.; TAN, D. X.; BURKHARDT, S. reactive oxygen and nitrogen species
1971 and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. *Mech. Ageing.*
1972 *dev.*, v. 123, n. 8, p. 1007-1019, 2002.
- 1973 REITER, R. J.; TAN, D. X.; FUENTES-BROTO, L. Melatonin: a multitasking
1974 molecule. *Prog. Brain. Res.*, v. 181, p. 127-151, 2010.
- 1975 ROBINSON, R.; BARATHI, V. A.; CHAURASIA, S. S.; WONG, T. Y.; TIMOTHY, S.
1976 Kern Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to
1977 mice and higher mammals. *Disease Models & Mechanisms*, v. 5, p. 444-456,
1978 2012.
- 1979 RODRIGUEZ, C.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTÍN,
1980 V.; REITER, R. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin.
1981 *J. Pineal. Res.*, v. 36, p. 1–9, 2004.
- 1982 ROLLAG, M. D.; BERSON, D. M.; PROVENCIO I. Melanopsin ganglion-cell
1983 photoreceptors, and mammalian photo entrainment. *J. Biol. Rhythms*, v.18, p. 227-
1984 234, 2003.
1985
- 1986 ROSA, D. P. Tese (Doutorado)-Universidade Federal Rio Grande do Sul, Faculdade
1987 de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências médicas, Porto
1988 Alegre, BR-RS, 2013.
1989
- 1990 ROSEN, P.; NAWROTH, P. P.; KING, G.; MOLLER, W.; TRITSCHLER, H. J.;
1991 PACKER, L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes
1992 and its complication: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO
1993 MCBN, the American Diabetes Association, and the German Diabetes Society.
1994 *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, v. 17 p. 189–212, 2001.
- 1995 SABETSKY, V.; EKBLOM, J. Insulin: A new era for an old hormone. *Pharmacol*
1996 *Research*, v. 61, p. 1-4, 2010.
- 1997 SAFATLE, A. M. V.; LISAKI, R.; OTSUKI, D. A.; GOMES, D. Determinação dos
1998 valores normais do eletrorretinograma de campo total em cães da raça *Poodle*
1999 portadores de catarata de acordo com a faixa etária *Ciência Rural*, v. 40, n. 3, p.
2000 587-593, 2010.
- 2001 SAKAI, H.; TANI, Y.; SHIRASAWA, E. SHIRAO Y.; KAWASAKI, K. Development of
2002 Electrorretinographic Alterations in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats
2003 *Ophthalmic. Res.*, v.27, p. 57–63, 1995.
2004

- 2005 SALTIEL, A. R.; KAHN, R. C. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid
2006 metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799 – 812, 2001.
- 2007 SALIDO, E. M.; BORDONE, M.; LAURENTIIS, A.; CHIANELLI, M.; SARMIENTO, M.
2008 I. K.; DORFMAN, D.; ROSENSTEIN, R. E. Therapeutic efficacy of melatonin in
2009 reducing retinal damage in an model of early type 2 diabetes in rats. **J. Pineal. Res**,
2010 v. 54, p. 179–189, 2013.
- 2011 SALOMÃO, S. R. Eletrofisiologia Visual nas Uveítes. In: ABREU, M. T. (ORG.).
2012 **Inflamações oculares**. São Paulo: Editora Roca, 2002. P. 162-189.
2013
- 2014 SANTIESTEBAN, R. P.; PLASENCIA, M. F.; FREIXAS, R. S.; SALGADO, M. C.;
2015 SANTIESTEBAN, C. E. M. Electrorretinograma: valores normales con diferentes
2016 protocolos de estudio. *Rer Cubana. Oftalmol*, v. 18, p. 864-2176, 2005.
- 2017 SANES, J. R.; ZIPURSKY, S. L. Design principles of insect and vertebrate visual
2018 systems. **Neuron**, v. 66, p. 15-36, 2010.
- 2019 SCHRODER, S.; PALINSKI, W.; SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Activated monocytes
2020 and granulocytes, capillary nonperfusion, and neovascularization in diabetic
2021 retinopathy. **Am. J. Pathol**, v.139, n. 1, p. 81-100, 1991.
- 2022 SENGER, D. R.; GALLI, S. J.; DVORAK, A. M.; PERRUZZI, C. A.; HARVEY, V. S.;
2023 DVORAK, H. F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes
2024 accumulation of ascites fluid. **Science**, v. 219, n. 4587, p. 983–985, 1983.
- 2025 SERRARBASSA, P. D.; DIAS, A. F. G.; VIEIRA, M. F. Novos conceitos em
2026 retinopatia diabética: dano neurológico versus dano vascular. **Arq. Bras .Oftalmol**,
2027 v. 71, n. 3, p. 459-63, 2008.
- 2028 SEVERNS, M. L.; JOHNSON, M. A.; BRESNICK, G. H.; Methologic dependence of
2029 electroretinogram oscillatory potential amplitudes **Doc. Ophthalmol**, v. 86, p. 23-31,
2030 1994.
- 2031 SHARPE, P. C.; LIU, W. H.; YUE, K. K, M.; MCMASGTER, D.; CATHERWOOD, M.
2032 A.; MCGINTY, A. M.; TRIMBLE, E. R. Glucose-induced oxidative stress in vascular
2033 contractile cells: comparison of aortic smooth muscle cells and retinal pericytes.
2034 **Diabetes**, v. 47, p. 801–809, 1998.
2035
- 2036 SHAO, Z.; DORFMAN, A. L.; SESHADRI, S.; DJAVARI, M.; KERMORVANT-
2037 DUCHEMIN, E.; SENNLAUB, F.; BLAIS, M.; POLOSA, A.; VARMA, D. R.; JOYAL, J.
2038 S.; LACHAPELLE, P.; HARDY, P.; SITARAS, N.; PICARD, E.; MANCINI, J.;
2039 SAPIEHA, P.; CHEMTOB, S. Choroidal involution is a key component of oxygen-
2040 induced retinopathy. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, v.52, n. 9, p. 6238–6248, 2011.
- 2041 SHERWIN, R. S. **Diabetes mellitus**. In: Goldman L, Bennett J.C. Cecil textbook of
2042 medicine. 21 ed. Philadelphia: Saunders; p.1263-85, 2000.
- 2043 SHWEIKI, D.; ITIN, A.; SOFFER, D.; KESHET, E. Vascular endothelial growth factor
2044 induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature**, v. 359, n.
2045 6398, p. 843–845, 1992.
- 2046 SIU, A. W. MALDONADO, M.; SANCHEZ-HIDALGO, M.; TAN, D. X.; REITER, R. J.
2047 Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases.
2048 **J. Pineal. Res**, v. 40, p. 101–109, 2006.

- 2049 SILVA, M. H. M.; PACHECO, M. R.; GIRARDI, A. M.; BARALDI-ARTONI, S. M.;
2050 SANTOS, E.; BARREIRO, F. R. Avaliação morfométrica dos hepatócitos de ratos
2051 diabéticos tratados com neem (azadirachta indica a. Juss) e estrepto-zootocina 6 ch.
2052 **Acta. Vet. Bras**, v. 5, n. 3, p. 270-277, 2011.
- 2053 SIMA, A. A. F.; SUGIMOTO, K. Experimental diabetic neuropathy: an update.
2054 **Diabetologia**, v. 42, p. 773-788, 1999.
- 2055 SIMS, M. H.; ELECTRODIAGNOSTIC EVALUATION OF VISION. IN: Gellat k.n.
2056 veterinary ophthalmology. 3.ed. PHILADELPHIA: LIPPINCOTT WILIAMS e
2057 WILKINS, p.483-507, 1999.
- 2058
- 2059 SLOMINSKI, R. M.; REITER, R. J.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.; OSTROM, R.
2060 S.; SLOMINSKI, A. T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues:
2061 distribution and functions. **Mol. Cell. endocrinol**, v. 351, n. 2, p. 152-166, 2012.
- 2062 SOARES, A. V. A contribuição visual para o controle postural. **Rev.Neuro.cienc**, v.
2063 18, n. 3, p. 370-379, 2010.
- 2064 SOBRIN, L., GREEN, T., SIM, X., JENSEN, R. A., TAI, E. S., TAY, W. T., WANG, J.
2065 J., MITCHELL, P., SANDHOLM, N., LIU, Y.; HIETALA, K.; IVENGAR, S. K.;
2066 BROOKS, M.; BURACZYNSKA, M.; VAN ZUYDAM, N.; SMITH, A. V.; GUDNASON,
2067 V.; DONEY, A. S.; MORRIS, A. D.; LEESE, G. P.; PALMER, C. N.; SWAROOP, A.;
2068 TAYLOR, H. A. JR.; WILSON, G. P.; PENMAN, A.; CHEN, C. J.; GROOP, P. H.;
2069 SAW, S. M.; AUNG, T.; KLEIN, B. E.; ROTTER, J. I.; SISCOVICK, D. S.; COTCH, M.
2070 F.; KLEIN, R.; DALY, M. J.; WONG, T. Y. Candidate gene association study for
2071 diabetic retinopathy in persons with type 2 diabetes: the Candidate gene Association
2072 Resource (CARE). **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, v. 29, p. 7593-7602, 2011.
- 2073 SOURRIS, K. C.; MORLEY, A. L.; KOITKA, A.; SAMUEL, P.; COUGHLAN, M. T.;
2074 PENFOLD, S. A.; THOMAS, M. C.; BIERHAUS, A.; NAWROTH, P. P.; YAMAMOTO,
2075 H.; ALLEN, T. J.; WALTHER, T.; HUSSAIN, T.; COOPER, M. E.; FORBES, J. M.
2076 Receptor for ages (rage) blockade may exert its renoprotective effects in patients
2077 with diabetic nephropathy via induction of the angiotensin ii type 2 (at2) receptor.
2078 **Diabetologia**, 53, n. 11, p. 2442-2451, 2010.
- 2079 TZECOV, R.; ARDEN, G. B. The electroretinogram in diabetic retinopathy. **Surv.**
2080 **Ophthalmol**, v. 44, n. 1, p. 53-60, 1999.
- 2081 SOUSA, C. E. C.; CRUZ-MACHADO, S. S.; TAMURA, E. K. Os ritmos circadianos e
2082 a reprodução em mamíferos. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**. Juiz
2083 de Fora, v. 27 , (n. 1/2), p. 15-20, 2008.
- 2084 STRAUSS, O. The retinal pigment epithelium in visual function. **Physiol. Rev**, v. 85,
2085 n. 3, p. 845-81, 2005.
- 2086 STEFULJ, J.; HORTNER, M.; GHOSH, M.; SCHAUENSTEIN, K.; RINNER, I.;
2087 WOLFLER, A.; SEMMLER, J.; LIEBMANN, P. M. Gene expression of the key
2088 enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. **J. Pineal Res.**, v.
2089 30, p. 243-247, 2001.
- 2090 SUZUKI, S.; TANAKA, K.; SUZUKI, N. (2009) Ambivalent aspects of interleukin-6 in
2091 cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. **J Cereb Blood Flow**
2092 **Metab** v. 29, p. 464-479.

2093 THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATION TRIAL. **N. Engl. J. Med.**, v. 342,
2094 p.381-9, 2000.

2095 TOPAL, T.; PZTAS, Y.; KORKMAZ, A.; SADIR, S.; OTER, S.; COSKUN, O.; BILGIC,
2096 H. Melatonin ameliorates bladder damage induced by cyclophosphamide in rats. **J.**
2097 **Pineal. Res**, v. 38, p. 272–276, 2005.

2098 TONET, A. C.; KARNIKOWSKI, M.; MORAES, C. F.; GOMES, L.; KARNIKOWSKI,
2099 M. G. O.; CORDOVA, C.; NÓBREGA, O. T. Association between the -174 G/C
2100 promoter polymorphism of the interleukin- 6 gene and cardiovascular disease risk
2101 factors in Brazilian older women. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 41, n. 1, p. 47-53, 2008.

2102 TRUONG, A.; WONG, T. Y.; KHACHIGIAN, L. M. Emerging therapeutic approaches
2103 in the management of retinal angiogenesis and edema. **J. Mol. Med**, v. 89, p. 343-
2104 361, 2011.

2105 UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose
2106 control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes
2107 (UKPDS 34). **Lancet**. v. 352, p .854–865, 1998.

2108 VALIATTI, F. B.; CRISPIM, D.; BENFICA, C.; VALIATTI, B. B.; CAROLINE K. K.;
2109 CANANI, L. H. Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e
2110 na retinopatia diabética. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**. v. 55, n. 2, p. 106-113,
2111 2011.

2112 VICENT, L.; COHEN, W.; DELAGRANGE, P.; BOUTIN, J. A.; NOSJEAN, O.
2113 Molecular and cellular pharmacological properties of 5-methoxycarboniylamino-N-
2114 acetyltryptamine (MCA-NAT): a nonspecific MT3 ligand. **J. Pineal. Res**, v. 48, n. 3, p.
2115 222-229, 2010.

2116 WANG, F. H., LIANG, Y. B., ZHANG, F., WANG, J. J., WEI, W. B., TAO, Q. S., SUN,
2117 L. P., FRIEDMAN, D. S., WANG, N. L. WONG, T. Y. Prevalence of diabetic
2118 retinopathy in rural China: the Handan eye study. **Ophthalmol**, v. 116, n. 3, p.
2119 461467, 2009.

2120 WIECHMANN, A. F.; SUMMERS, J. A. Circadian Rhythms in the eye: The
2121 physiological significance of melatonin receptors in ocular tissue. **Prog. Ret. Eye**
2122 **Res**, v. 27, p. 137–160, 2008.

2123 WILKINSON, C. P.; FERRIS, F. L. R. D.; KLEIN, R. E.; LEE, P. P.; AGARDH, C. D.;
2124 DAVIS, M.; WILKINSON, C. P.; FERRIS, F. L. R. D.; KLEIN, R. E.; LEE, P.
2125 P.; AGARDH, C. D.; DAVIS, M.; DILLS, D.; KAMPIK, A.; PARARAJASEGARAM,
2126 R.; VERDAGUER, J. T. Proposed international clinical diabetic retinopathy and
2127 diabetic macular edema disease severity scales. **Ophthalmology**, v. 110, p. 1677-
2128 82, 2003.

2129 WIROSTKO, B.; WONG, T. Y.; SIMO, R. Vascular endothelial growth factor and
2130 diabetic complications. **Prog. Retin. Eye. Res**, v. 27, p. 608-621, 2008.

2131 WITT-ENDERBY, P. A.; BENNETT, J.; JARZYNKA, M. J.; FIRESTINE, S.; MELAN,
2132 M. A. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural
2133 mechanisms. **Life. Sci**, v. 72, p. 2183-2198, 2003.

2134 WHITING, D. R.; GUARIGUATA, L.; WEIL, C.; SHAW, J. IDF Diabetes Atlas: Global
2135 estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diab. Res. Clin. Prac**, v.
2136 94, p. 311-321, 2011.

2137 WONG, T. Y., CHEUNG, N., TAY, W. T., WANG, J. J., AUNG, T., SAW, S. M., LIM,
2138 S. C., TAI, E. S. AND MITCHELL, P. Prevalence and risk factors for diabetic
2139 retinopathy: the Singapore Malay Eye Study. **Ophthalmology**, v. 115, p. 1869-1875,
2140 2008.

2141
2142 WOLTER, J. R. Diabetic retinopathy. **Am. J. Ophthalmol.** v. 51, p. 1123– 1141,
2143 1961.

2144
2145 YAMAZAKI, R. K. Redução da glicemia em ratos diabéticos tratados com sais de
2146 vanádio peroxidados identificação de proteínas intracelulares envolvidas no
2147 mecanismo de ação em músculo sóleo. 2004. 51 f. Dissertação (mestrado em
2148 biologia celular e molecular) -Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

2149
2150 YONEMURA, D.; TSUSUKI, S.; AOKI, T. Clinical importance of the oscillatory
2151 potential in the human erg. **Acta. Ophthalmol**, v. 70 p. 115-123, 1962.

2152 XIN, H.; ZHOU, F.; LIU, T.; LI, G. Y.; LIU, J.; GAO, Z. Z.; BAI, G. Y.; LU, H.; XIN, Z.
2153 C. Icariin Ameliorates Streptozotocin-Induced Diabetic Retinopathy in Vitro and in
2154 Vivo. **Int. J. Mol. Sci**, v. 13, p. 866-878, 2012.

2155 ZAGON, I. S.; SASSANI, J. W.; MCLAUGHLIN, P. J. Insulin treatment ameliorates
2156 impaired corneal reepithelialization in diabetic rats. **Diabetes**. v. 55, p. 1141-1147,
2157 2006.

2158 ZHANG, X.; SAADDINE, J. B.; CHOU, C. F.; COTCH, M. F.; CHENG, Y. J.; GEISS,
2159 L. S.; GREGG, E. W.; ALBRIGHT, A. L.; KLEIN, B. E.; KLEIN, R. Prevalence of
2160 diabetic retinopathy in the United States, 2005-2008. **JAMA**, v. 304, p. 649-656,
2161 2010.

2162 ZHANG, J; WU, S. M. Goalpha labels On bipolar cells in the tiger salamander retina.
2163 **J. Comp. Neurol**, v. 461, p. 276-289, 2003.

2164 ZLOTOS, D. P.; JOCKERS, R.; CECON, E.; RIVARA.; WITT ENDERBY, P. A. MT(1)
2165 and MT(2) Melatonin receptors: Ligands, Models, Oligomers, and Therapeutic
2166 Potencial. J. Med. Chem, in press, 2013.

2167

CAPÍTULO II

Potencial terapêutico da melatonina sobre o estresse oxidativo (retina e pâncreas),
histopatologia e atividade elétrica na retina em ratos com retinopatia diabética

Ismaela Maria Ferreira de Melo¹, Cíntia Giselle Martins Ferreira¹, Elton Hugo Lima da Silva
Souza¹, Telga Lucena Alves Craveiro de Almeida¹, Leucio Duarte Vieira Filho², Fabrício
Bezerra de Sá¹, Valéria Wanderley Teixeira¹, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira^{1*}

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
Animal, Recife, Brasil

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro
de Ciências Biológicas, Recife, Brasil

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois
Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389E-mail:
teixeira.alvaro@outlook.com (TEIXEIRA, A.A.C.)

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da melatonina quando administrada simultaneamente e após indução ao diabetes, sobre o estresse oxidativo (retina e pâncreas), histopatologia e atividade elétrica da retina em ratos com retinopatia diabética. Utilizou-se 50 ratos divididos nos seguintes grupos: **GC:** ratos sem indução ao diabetes pela estreptozotocina; **GD:** ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com placebo; **GDM:** ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e após confirmação do diabetes tratados com melatonina na dosagem de 10 mg/kg de peso corporal durante 20 dias; **GDMS:** ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e simultaneamente tratados com melatonina na dosagem de 10mg/kg durante 20 dias; **GDI:** ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e após confirmação do diabetes tratados com insulina durante 20 dias. O diabetes foi induzido pela administração intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg), e a insulina (5 U/dia) foi administrada via subcutânea. O estresse oxidativo pancreático foi avaliado através da peroxidação lipídica e níveis de glutathione reduzida. Para retina foi avaliado a produção de ânion superóxidos e atividade elétrica. Os resultados mostraram que as retinas do grupo diabético apresentaram desorganização das camadas retinianas, microaneurismas, tortuosidades e dilatação vascular, no entanto, exceto no eletrorretinograma, a melatonina melhorou todos os parâmetros analisados isso porque ela atuou de forma a diminuir o processo inflamatório e regulou os mecanismos que ocasionaram estresse oxidativo. Assim, concluímos que a melatonina pode ser um importante fator coadjuvante no tratamento da retinopatia diabética principalmente quando administrada simultaneamente à indução do diabetes.

Palavras chave: Eletrorretinograma, estresse oxidativo, melatonina, ratos, retinopatia diabética.

Abstract: The purpose of this study was to evaluate the effect of melatonin when administered simultaneously and after induction of diabetes, on oxidative stress (retina and pancreas), histopathology and electrical activity of the retina in mice with diabetic retinopathy. We used 50 rats divided into the following groups: GC: no induction mice diabetes by streptozotocin; GD: rats induced by streptozotocin diabetes and treated with placebo; GDM: rats by streptozotocin induced diabetes mellitus and after confirmation treated with melatonin at dosage of 10 mg / kg body weight for 20 days; GDMS: mice induced by streptozotocine diabetes and simultaneously treated with melatonin at a dose of 10mg / kg for 20 days; GDI: rats by streptozotocin induced diabetes mellitus and after confirmation treated with insulin for 20 days. Diabetes was induced by intraperitoneal administration of streptozotocin (60 mg / kg) and insulin (5 U / day) was administered subcutaneously. The pancreatic oxidative stress was evaluated by lipid peroxidation and reduced glutathione levels. To retina was evaluated the production of superoxide anion and electrical activity. The results showed that the retinas of diabetic group showed disorganization of retinal layers, microaneurysms, tortuosity and vascular dilation, however, except in the electroretinography, melatonin improved all parameters analyzed because she acted in order to reduce the inflammatory process and regulated the mechanisms that caused oxidative stress. Thus, we concluded that melatonin may be an important contributing factor in the treatment of diabetic retinopathy especially when administered simultaneously to the induction of diabetes.

Keywords: Electroretinogram, oxidative stress, melatonin, mice, diabetic retinopathy

Introdução

A retinopatia diabética faz parte das complicações microvasculares do diabetes, associada à longa duração da doença e ao controle glicêmico inadequado (ALVES et al., 2014). Ela é uma microangiopatia que afeta pequenos vasos da retina, arteríolas, capilares e vênulas, sendo a lesão vascular a principal causa das complicações que são observadas na retina devido ao acúmulo de proteínas glicadas nos tecidos quando a glicose encontra-se em concentrações elevadas (MORENO; LOZANO; SALINAS 2013).

Em pacientes diabéticos, as lesões celulares e teciduais podem ser provocadas por um aumento na concentração de espécies reativas ao oxigênio ou nitrogênio e isto está relacionado a alterações bioquímicas em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, modificando a homeostase e função celular, responsáveis pelas alterações fisiopatológicas e complicações desta enfermidade (MARITIM; SANDERS; WATKINS 2003). Dessa forma, o estresse oxidativo é considerado um dos principais fatores envolvidos nessa patogênese levando a alterações estruturais e funcionais, tais como perda acelerada de células capilares na microvasculatura retiniana, aumento na permeabilidade vascular e aumento na formação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (KOWLURU; CHAN, 2007; KAUR, 2008).

Assim, a hiperglicemia tem um papel crucial na fase inicial da doença, enquanto que o estresse oxidativo aumenta o dano tecidual e as complicações diabéticas ao longo dos anos (GIACCO; BROWNLEE 2010). A exposição da vasculatura à hiperglicemia e o aumento dos ácidos graxos livres característicos do diabetes mellitus e estados de resistência à insulina induzem a produção de superóxidos (CAPELLINE et al., 2010). Todavia, o sistema de defesa antioxidante tenta neutralizar os efeitos prejudiciais dessas espécies reativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE 2007). Outro fator relacionado com o estresse oxidativo é a função da NADPH oxidase. Ellis et al. (1998) mostraram que sua atividade é aumentada em ratos

diabéticos e que as complicações vasculares ocasionadas pelo estresse são os responsáveis pelo aumento desse fator (GRASSI 2003).

Por outro lado, o sistema antioxidante é responsável por manter o equilíbrio entre as substâncias pró-oxidantes e antioxidantes as quais o organismo fica exposto. Esse sistema compreende enzimas como a superóxido dismutase, catalase, e a glutathione peroxidase (HALLIWELL; GUTTERIDGE 1999). Inúmeros estudos demonstraram que a administração de antioxidantes exógenos e seus subprodutos, podem auxiliar o sistema antioxidante endógeno a combater a injúria celular provocada pelas espécies reativas (EREJUWA et al., 2010; NIXDORF; GUTIERREZ, 2010)

A melatonina tem demonstrado ser um potente antioxidante e sequestrador de radicais livres (BONNEFONT-ROUSSELOT; COLLINS 2010). Além disso, ela estimula a expressão de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase (REITER et al., 2001; BAYDAS et al., 2001), ademais, ela está envolvida no controle dos ritmos biológicos (ARENDT, SKENE 2005), na regulação da reprodução (REITER et al., 2009) e na imunomodulação (GUERRERO; REITER 2002). Pesquisas mostraram que a melatonina reduziu danos na córnea de animais com diabetes induzidos por estreptozotocina (MEHMET et al., 2008), e, em um modelo de isquemia induzida, ela bloqueou a apoptose em células do epitélio pigmentar mantidas em cultura (OSBORNE et al., 1998).

Sabendo-se que a melatonina é conhecida por ser um dos maiores antioxidantes naturais, a presente pesquisa teve o objetivo de testar a hipótese de que a melatonina exógena pode neutralizar os efeitos adversos promovidos pelo estresse oxidativo na retinopatia diabética.

2. Materiais e Métodos

Foram utilizados 50 ratos machos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, com 90 dias de idade, pesando em torno de 300 ± 30 g, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para isto, este projeto foi submetido ao comitê de ética institucional e aprovado sob número de protocolo 23082.022.699/2013 e licença N° 011/2014. Esses animais foram mantidos em gaiolas, com alimentação e água *ad libitum*, na temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação artificial que estabeleceram um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 06:00 às 18:00h. Os animais foram divididos ao acaso em 5 grupos, cada um com 10 animais: **GC**: ratos sem indução ao diabetes pela estreptozotocina; **GD**: ratos com diabetes induzidos pela estreptozotocina e tratados com placebo; **GDM**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e após confirmação do diabetes (7° dia) tratados com melatonina na dosagem de 10 mg/kg de peso corporal durante 20 dias; **GDMS**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e simultaneamente tratados com melatonina na dosagem de 10 mg/kg de peso corporal durante 20 dias; **GDI**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e após confirmação do diabetes tratados com insulina durante 20 dias.

2.1 Indução do diabetes

O diabetes foi induzido pela administração intraperitoneal de solução de estreptozotocina (Sigma Chemical Co., USA) após jejum alimentar de 14 horas e confirmado no sétimo dia após a aplicação. A estreptozotocina foi diluída em tampão citrato de sódio a 10 mM e pH 4,5, na dosagem única de 60 mg/kg de peso do animal. Os animais não diabéticos

(grupo controle) receberam da mesma forma, doses equivalentes de solução salina e decorridos 30 minutos da administração todos os animais foram alimentados normalmente (DALL'AGO et al., 2002). Foram incluídos no estudo apenas animais que apresentaram glicose sanguínea acima de 200 mg/dL (Glicosímetro Kit Accu-Chek Activ), exceto do grupo controle, para início do tratamento com a melatonina ou insulina.

2.2 Administração da melatonina

A administração da melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi realizado por meio de injeções subcutânea no início da noite (18:00) durante 20 dias (GUVEN et al., 2006) na dosagem de 10 mg/kg (SUDNIKOVICH et al., 2007). A melatonina foi dissolvida em etanol e diluída em salina na proporção de 1:9 (OZGUNER; BARDAK; COMLEKCI 2006).

2.3 Administração de insulina

A insulina foi administrada por via subcutânea durante 20 dias, na dose de 5 U/dia, sendo duas unidades de insulina às 10 h e 3 unidades restantes às 19 h (PINHEIRO et al., 2011).

2.4 Dosagem de insulina

As amostras de sangue foram coletadas nos períodos antes da indução, 10 e 20 dias após tratamento. Para isso, os ratos foram imobilizados em contensor mecânico e o sangue coletado por punção da veia caudal lateral com uso de cateter (24G) (PEREIRA 2001). Após centrifugação refrigerada, o plasma foi acondicionado em microtubos, em duplicata, e congelado a -20°C até o momento das dosagens (TEIXEIRA et al., 2004). A insulina plasmática foi determinada pelo método de ELISA utilizando "kit" comercial específico para rato (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA - EUA).

2.5 Exame histopatológico da retina

Os animais dos grupos experimentais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6,0 mg/kg) por via intramuscular e em seguida foi feita a enucleação do olho direito, no qual foi feita uma incisão na córnea para penetração do fixador, após isso eles foram eutanasiados com tiopental sódico 100 mg/kg. O material foi fixado em formol tamponado por 48 h e posteriormente, processado para inclusão em parafina. Os cortes foram submetidos as colorações hematoxilina eosina, para análise histopatológica em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49.

2.6 Produção de ânions superóxido e atividade da NADPH oxidase

Ânions superóxidos (O_2^-) foram medidos na retina de 5 ratos de cada grupo experimental, totalizando 25 amostras. Os tecidos foram homogeneizados em tampão RIPA (50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% triton X-100, 1% desoxicolato, SDS a 1% suplementado com um coquetel inibidor de protease), numa proporção de 1 g de tecido para cada 7 mL de volume. O homogeneizado foi centrifugado (NT805, Novatecnica,

Piracicaba, SP) a 12000 x g 4°C durante 12 minutos. O sobrenadante foi diluído em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4), numa proporção de 1:10 mL. Resumidamente, a solução foi aquecida a 37 °C e quimioluminescência foi medida durante 10 minutos (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia), após a adição de 10 µM lucigenina. A quimioluminescência foi medida na ausência e na presença de 100 µM de NADPH. Os ensaios foram realizados em triplicata (ATTIA et al., 2001).

2.7 Marcadores de estresse oxidativo no pâncreas

O estresse oxidativo pancreático foi avaliado através da mensuração da peroxidação lipídica e dos níveis de glutathione reduzida. A peroxidação lipídica foi estimada através da medida dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (OHKAWA; OHISHI; YAGI 1979) enquanto a glutathione reduzida foi determinada através da mensuração de grupamentos sulfidrilas não proteicos (SEDLAK; LINDSAY 1968). Para isso, fragmentos do pâncreas foram macerados em KCl, 1, 15%, numa proporção de 10 mL/1g, até completa homogeneização do material coletado. O homogenato foi transferido para um tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 2 mL do reagente (0,375% ácido tiobarbitúrico e 75% ácido tricloroacético) para cada mL da mistura. Os tubos em duplicata foram lacrados e aquecidos em banho maria (100 °C) durante 15 minutos. O sobrenadante foi separado, e a absorbância medida a 535 nm (BUEGE; AUST 1978).

2.8 Eletroretinograma

O sistema utilizado foi o da Nihon Kohden, Neuropack 2 MEB-7102A/k, com o seu sinal digitalizado pelo DATAQ[®] DI-158U através de um cabo RS232 com três canais. O foto estimulador, com uma luz de Light-emitting diode (LED) de cor branca 7000 K e uma angulação de 20 °. Os eletrodos utilizados, foram subdérmicos da Ambu[®] modelo Neuroline

subdermal 12x0.40 mm e o eletrodo de córnea da Universo SA, modelo ERG-jet™ conectados ao Electrode Junction Box JB-711B do Neuropack 2 MEB-7102A/k. Para a realização do exame os animais foram contidos manualmente, e os olhos vedados e mantidos em ambiente escuro por 20 minutos para posterior realização dos estímulos em ambiente escotópico. Após 15 minutos de adaptação em ambiente com luz vermelha foi feita a sedação com sulfato de quetamina (20 mg/Kg) por via intramuscular; passados cinco minutos foi instilada colírio anestésico corneal com cloridrato de proximetacaína 0,5% e lubrificação com metilcelulose 2%, posteriormente iniciou-se o exame. Os ERGs foram registrados a partir de duas colocações monopolares de eletrodos, sendo um colocado 0,5 cm da comissura temporal (eletrodo referência) e outro entre os olhos do animal (eletrodo terra). O eletrodo corneal monopolar (DTL) ativo foi colocado sobre a córnea do olho a ser examinado. Para o teste de bastonetes realizou-se um estímulo luminoso de 100 mcd/m^{-2} , com frequência de 0,2 Hz, totalizando quatro estímulos. No teste cones mais bastonetes após 10 minutos de adaptação ao claro, foi realizado um estímulo luminoso de 3000 mcd/m^{-2} em uma frequência de 0,1 Hz, sendo um total de cinco estímulos. Após a adaptação ao ambiente com luz (10 minutos há 30000 mcd/m^{-2}), foram realizados os testes fotópicos, com estímulo luminoso de 3000 mcd/m^{-2} , em uma frequência de 2 Hz, sendo um total de cinco estímulos. Em seguida realizou-se o flicker, com estímulo luminoso de 3000 mcd/m^{-2} , em uma frequência de 30 Hz. Os resultados foram gerados e impressos pelo aparelho utilizado no exame, e avaliados considerando as amplitudes em microvolts (μV) e latências (tempo implícito) em milissegundos (ms). O tipo de estudo utilizado foi o observacional transversal, com a demonstração do eletrorretinograma em ambiente escotópico e fotópico sob o estímulo de luz branca.

2.9 Histoquímica com peroxidase de rábano

Para demonstração dos vasos da retina, os animais dos grupos experimentais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6,0 mg/kg), em seguida foi administrado 25 mg de peroxidase de rábano diluído em 0,3 ml de soro fisiológico pela veia cava caudal e foi aguardado 15 minutos para eutanásia e enucleação dos olhos. A eutanásia foi feita com tiopental sódico 100 mg/kg e os olhos enucleados foram imersos em 0,1 M de PBS (pH 7,2-7,4). Em seguida, as retinas foram dissecadas como peças inteiras, fazendo quatro radial cortes na retina superior, inferior, temporal e nasal. Logo após, elas foram fixadas durante uma hora em paraformaldeído a 4%, lavadas em PBS, reagidas com a reação de Hanker-Yates modificado (LINDEN; PERRY, 1983). Finalmente, as retinas foram lavadas e montadas com lâminas com uma pequena quantidade de uma solução de anti-fading (500 ml Glicerina, 500 ml Tampão carbonato de sódio e 0,04g P-fenilenodiamino).

2.10 Níveis glicêmicos

A glicemia dos animais foi monitorada durante o período experimental, sendo medida com o auxílio de um Glicosímetro Kit Accu-Chek Activ, nos momentos antes da indução, confirmação do diabetes, 10 e 20 dias das administrações de melatonina ou insulina.

2.11 Análise estatística

Os dados da quantificação dos níveis plasmáticos de insulina, glicose, e os valores teciduais de GSH e TBARS, foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, e as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Níveis glicêmicos

Antes da indução do diabetes os animais de todos os grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas nos níveis de glicose sanguínea, mostrando valores abaixo de 120 mg/dL. Após a indução, todos os animais, com exceção os do grupo controle (GC), apresentaram níveis sanguíneos de glicose acima de 300 mg/dL, diferindo significativamente deste grupo, confirmando assim o quadro de diabetes. Após 10 e 20 dias de tratamento com melatonina ou insulina evidenciou-se que o único grupo que apresentou o nível de glicose semelhante ao grupo controle foi o administrado com insulina (GDI). No entanto, o grupo GDMS apresentou valor hiperglicêmico significativamente menor que os grupos GD e GDM (Tabela 1). Além disso, foi observado que no grupo GDMS os valores da glicemia apresentaram numericamente uma tendência ao decaimento quanto maior foi o tempo de administração de melatonina.

3.2 Níveis plasmáticos de insulina

A dosagem dos níveis plasmáticos do hormônio insulina revelou que antes da indução ao diabetes pela estreptozotocina, todos os ratos apresentaram valores sem diferença estatística em relação ao grupo controle (Fig 4A). Entretanto, as amostras de plasma coletadas e analisados após 10 e 20 dias das respectivas administrações de melatonina ou insulina, observou-se que apesar de um aumento significativo nos valores da insulina plasmática nos animais do grupo administrado com melatonina a partir do dia de indução ao diabetes (GDMS), apenas o grupo diabético tratado com insulina apresentou valores similares aos dos animais do grupo controle, restaurando assim, seus níveis hormonais. (Figs. 4B e 4C).

3.3 Estresse oxidativo pancreático

A análise tecidual dos níveis de GSH nos grupos tratados com melatonina ou insulina foram superiores aos animais do grupo GC e GD. (Fig. 5). Em relação às concentrações teciduais dos níveis na peroxidação lipídica pancreática não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (Fig. 6).

3.4 Produção de ânions superóxido e atividade da NADPH oxidase na retina

Em relação à produção basal de ânions superóxidos e a atividade da NADPH oxidase, observou-se um aumento significativo dessas substâncias apenas no grupo diabético (GD) em relação aos demais grupos experimentais (Figs. 7A e 7B).

3.5 Análise histopatológica da retina

Nas fotomicrografias são demonstradas as camadas da retina, tomando como referência inicial a porção interna do lado esquerdo, adjacente ao corpo vítreo (CV). Assim, a análise histopatológica de amostras de retina de ratos do grupo controle (Fig. 8A) revelou a presença de estruturas bem preservadas como a membrana limitante interna (cabeça da seta), camada de células ganglionares (g), camada plexiforme interna (pi), camada nuclear interna (ni), células amácrinas (setas curtas), camada plexiforme externa (pe), camada nuclear externa (ne), camada de bastonetes e cones (bc), epitélio pigmentar (setas tracejadas) e coróide (c).

Após exposição à estreptozotocina foi observado que o grupo diabético (Fig. 8B) apresentava desorganização da camada nuclear (ne) e plexiforme externa (pe) com presença de inúmeros vacúolos (setas longas), deslocamento seroso da retina (dupla seta) e vasos sanguíneos dilatados (asterisco) quadro típico de retinopatia diabética. Porém, após o tratamento com insulina (Fig. 8C) e melatonina (Fig. 8D) induziu menor progressão da retinopatia diabética. Verificou-se ainda, que no grupo tratado com melatonina simultaneamente (Fig. 8E) houve melhor preservação da retina.

3.6 Histoquímica com peroxidase de rábano

Em relação à análise histoquímica com peroxidase de rábano, foi observado que em todos os grupos experimentais de uma forma geral, os vasos apresentaram uniformização do padrão vascular (Figs. 9A-E). Contudo, os vasos dos animais do grupo diabético GD e do grupo tratado com insulina GDI apresentaram microaneurisma e tortuosidades caracterizando assim o quadro de retinopatia diabética. Porém, nos animais que receberam melatonina, observou-se na retina uma atenuação desses fatores (Figs 10A-E).

3.7 Eletrorretinograma

O exame de eletrorretinograma, em todas as suas formas (Escotópico, Fotópico, Misto e Flicker), demonstrou haver diferença estatística apenas na amplitude da onda *a* do exame da mista entre os grupos GC e GD (Figs. 11, 12, 13 e 14), mostrando assim uma possível perda na quantidade de fotorreceptores no grupo diabético em relação ao grupo controle.

4. Discussão

Nesse estudo, a análise histopatológica da retina juntamente com a histoquímica com peroxidase de rábano mostraram mudanças vasculares típicas de retinopatia diabética como tortuosidades e dilatação dos vasos sanguíneos, deslocamento e desorganização das camadas retinianas, além de microaneurisma. No entanto, nos animais dos grupos GDM e GDMS a administração suplementar de melatonina foi bem sucedida, pois reduziu as alterações microvasculares. Isso pode ser devido porque a melatonina é capaz de cruzar membranas biológicas (COSTA et al., 1995), e assim alcançar todos os compartimentos sub-celulares protegendo-os dos radicais livres (MILLAN-PLANO et al., 2003). Evidenciando assim seu caráter antioxidante e neuroprotetor (ACUNA-CASTROVIEJO et al., 2007). Além disso, é sabido que lesões causadoras de hipóxia como o diabetes, ocasionam angiogênese e impulsionam a produção do VEGF (ANDERSON et al., 2010). Esses neovasos apresentam constituição anatômica alterada levando a sangramento, exsudação e reação inflamatória (GUIMARÃES; GERENUTTI 2013). No entanto, Alvarez-García et al., (2013) relataram que a melatonina tem influência sobre a produção do VEGF, reduzindo a angiogênese e atuando sobre a ciclooxigenase 2 (COX-2) modulando a inflamação e inibindo a proliferação celular (WANG et al., 2012). Assim, a diminuição da secreção do (VEGF) pela melatonina pode ter sido o principal motivo da diminuição da deformidade vascular.

Em relação aos valores hiperglicêmicos, estudos têm demonstrado que a administração da melatonina não reduz os valores hiperglicêmicos na condição de diabetes (CAM et al., 2003; GUVEN et al., 2006). Por outro lado, relatos apontaram que a administração desse hormônio previamente a indução do diabetes experimental resulta em níveis hiperglicêmicos menores, indicando que a melatonina exerça uma tendência a diminuição da glicemia em ratos (PANDI-PERUMAL et al., 2008). Esses dados corroboram os nossos achados, pois a

melatonina administrada simultaneamente à indução do diabetes pela estreptozotocina provocou tênue redução da glicemia nesses animais. Ademais, foi observado que quanto maior foi o tempo de administração de melatonina, menor foi a média da glicemia, evidenciando o efeito protetor deste hormônio. Assim, a melatonina atuou contribuindo para a homeostase da glicose, seja diminuindo a neoglicogênese, seja revertendo a resistência à insulina aumentando a captação de glicose em adipócitos e músculos esqueléticos (SHIMA et al., 1997).

A análise da insulina plasmática revelou que só o grupo tratado com insulina restaurou os níveis desse hormônio semelhantemente ao grupo controle, no entanto, houve um aumento significativo da insulina quando administrado a partir do primeiro dia de indução do diabetes grupo (GDMS). Sabe-se que a glândula pineal apresenta receptores para diferentes hormônios, como por exemplo, a insulina, desta forma, a produção de melatonina sofre influência deste hormônio e vice-versa (CIPOLLA-NETO; AFECH 2008). Além da influência na produção de insulina ela aumenta a sensibilidade dos tecidos periféricos e do sistema nervoso à insulina por promover ativação dos seus receptores (PICIANATO et al., 2004) e por aumentar a síntese de transportadores de glicose como a GLUT 4 (SERAPHIM et al., 1997). Além disso, Yavuz et al. (2003) demonstraram que a melatonina evitou danos oxidativos causados pela estreptozotocina no pâncreas de ratos, protegendo desta forma as células beta. Isso, também pode ter contribuído para um possível efeito protetor deste hormônio quando aplicada simultaneamente sobre as células β pancreáticas dos ratos, que ainda apresentaram capacidade secretora de insulina.

Defesas antioxidantes encontram-se amplamente distribuídos no organismo e compreendem agentes que removem radicais livres, as proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes e os agentes de baixo peso molecular que aprisionam

2553 espécies reativas ao oxigênio, como a glutathiona reduzida (GSH), α -tocoferol, ácido ascórbico
2554 e bilirrubina (HALLIWELL; GUTTERIDGE 1999).

2555 Estudos prévios relataram que no diabetes os níveis de glutathiona encontram-se
2556 reduzidos e as enzimas de defesa antioxidantes estão prejudicadas e que este defeito pode ser
2557 corrigido pela suplementação com antioxidantes (KOWLURU; ENGERMAN; KERN 1999).
2558 Esses dados corroboram com os nossos estudos em que o grupo diabético apresentou menor
2559 valor comparado com o grupo tratado com melatonina GDM e o grupo insulina GDI. Assim,
2560 a melatonina pode agir sobre os radicais livres, indiretamente pela estimulação de várias
2561 enzimas antioxidantes como a glutathiona, e pela ação de seus metabólitos que atuam como
2562 varredores de radicais livres (REITER et al., 2013).

2563 A lipoperoxidação é um marcador de dano na membrana celular, e a sua medida foi
2564 estimada através dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. É sabido que os
2565 radicais livres promovem lipoperoxidação por interferir na configuração dos ácidos graxos e
2566 que os produtos dessa reação levam ao envelhecimento celular por rigidez e pouca eficiência
2567 da membrana, além disso, as membranas biológicas também têm seus lipídeos quimicamente
2568 alterados e a fosfodiesterase acionada, como resultado a membrana se rompe (TEIXEIRA
2569 2003). Neste trabalho, avaliamos a lipoperoxidação no tecido pancreático, contudo, não
2570 obtivemos diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. No entanto, Armstrong; Al-
2571 Awadi (1991) demonstraram uma elevação de 7 vezes no TBARS no plasma em 10 dias após
2572 indução do diabetes que aumentou para 15 vezes acima do normal em 22 dias e, em seguida,
2573 caiu drasticamente para valores abaixo do padrão no 39º dia. Além disso, as observações
2574 estabeleceram uma correlação entre a concentração de peroxidação lipídica e a estrutura e
2575 função da retina. Assim, a melatonina pode ter tido uma ação protetora no pâncreas, visto que,
2576 a análise de TBARS foi feita no 10º e 20º dia após tratamento com melatonina ou insulina.

2577 Uma potencial ligação entre a atividade da NADPH oxidase e reação vascular
2578 inflamatória tem sido sugerido por prévios estudos que mostraram que o diabetes induz o
2579 aumento no estresse oxidativo, na expressão do VEGF, na leucostase e na quebra da barreira
2580 hemato-retiniana (AL-SHABRAWAY et al., 2008). Pesquisas com artérias coronárias de
2581 suínos diabéticos mostraram que o aumento da NADPH oxidase foi acompanhada por
2582 regulação positiva de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- α), quimiocinas e moléculas de
2583 adesão celular vascular, proporcionando mais apoio para a função dela em doenças
2584 inflamatórias e vasculares como o diabetes (ZHANG et al., 2003). Um apoio adicional para o
2585 papel da NADPH-oxidase nas reações inflamatórias vasculares retinianas vem de estudos com
2586 modelo de uveítes e diabetes (NAGAI et al., 2007).

2587 Esses achados corroboram com os nossos resultados em que houve um aumento da
2588 atividade da NADPH oxidase no grupo diabético em relação ao controle, no entanto, os
2589 grupos tratados com melatonina e insulina não diferiram estatisticamente do grupo controle,
2590 possivelmente porque a melatonina bloqueou a ação dessa enzima, consequentemente
2591 inibindo a leucostase que ocorre na retinopatia diabética e que é a principal responsável pela
2592 ativação da NADPH oxidase.

2593 Segundo Brownlee (2001), a hiperglicemia leva à produção de ânions superóxidos nas
2594 células endoteliais em nível mitocondrial e isto está implicado na origem das complicações do
2595 diabetes mellitus. O ânion superóxido liga-se ao óxido nítrico (NO) prejudicando o endotélio
2596 (TABIT et al., 2010). As superproduções de superóxido e NO favorecem a formação de
2597 peroxinitrito, que apresenta ação citotóxica (SCHAAN; SILVA; IRIGOYEN 2010). Além
2598 disso, ocorre a ativação da proteína quinase C, a qual induz a síntese de NADPH oxidase, que
2599 também contribui para a produção de superóxidos (BROWNLEE 2001).

Sabe-se que a exposição da vasculatura à hiperglicemia e o aumento de ácidos graxos livres característicos do diabetes mellitus induzem à produção de superóxidos e que isto pode ser inibido por tratamento com antioxidantes em algumas situações (SCHAAN; SILVA; IRIGOYEN 2010). Esses dados também corroboram com os nossos resultados em que o grupo diabético apresentou um aumento desses ânions em relação ao grupo controle e uma diminuição nos grupos tratados com melatonina e insulina

O eletrorretinograma é um dos meios de avaliação da função da retina no animal vivo, principalmente na indicação de pacientes ao tratamento cirúrgico, da catarata e na diferenciação de doenças da retina (MARMOR et al., 2009).

Sakai et al. (1995) evidenciaram que as amplitudes e as latências dos picos das onda *a* e *b* em ratos diabéticos pela estreptozotocina durante 6 semanas não diferiram significativamente daqueles nos ratos controle. No entanto, Gualtieri (2004) encontrou alterado alguns componentes do eletrorretinograma de campo total em pacientes com diabetes tipo 2, como a diminuição da amplitude da onda *b* e dos potenciais oscilatórios além do aumento da latência. Esses achados corroboram em parte com nosso estudo o qual mostrou haver diferença estatística apenas na amplitude da onda *a* do exame da mista entre os grupos controle GC e o diabético GD. Mostrando assim uma perda na quantidade de fotorreceptores no grupo diabético. Desta forma podemos concluir que apesar dos trabalhos não apresentarem um padrão de resposta, em nosso estudo os grupos tratados com melatonina não diferiram em relação ao controle, o que pode ter sido devido as suas propriedades defensoras, várias linhas de pesquisa sugerem que a melatonina pode agir como um agente protetor em doenças oculares como catarata, glaucoma, retinopatias e injúrias isquêmicas (SIU et al., 2006). Além de seus efeitos antioxidantes, vários outros mecanismos estão envolvidos na neuroproteção, incluindo a diminuição no nível do fator de crescimento endotelial vascular (KAUR et al.,

2007) e da concentração sináptica de glutamato na retina (SÁENZ et al., 2004), bloqueio intracelular do aumento dos níveis de cálcio (PAPPOLLA et al., 1997) entre outros. Facilitando desta forma a atividade elétrica da retina.

Diante dos resultados, pode-se concluir que as retinas dos animais diabéticos estão mais vulneráveis aos danos decorrentes do quadro de diabetes e que a melatonina foi eficaz no seu tratamento, principalmente quando ela foi administrada simultaneamente à indução do diabetes, pois ela atuou preventivamente diminuindo a glicemia e preservando e melhorando as células da retina, além disso, ela agiu indiretamente, estimulando a produção de glutathione e insulina e diminuindo a produção de ânions superóxidos. No entanto, nesta pesquisa a melatonina não atuou na atividade elétrica. Assim, concluímos que a melatonina pode ser um importante agente terapêutico no tratamento coadjuvante da retinopatia diabética, devido a sua ação neuroprotetora.

5. Referências

- Acuna-Castroviejo, D.; Escames, G.; Rodriguez, M. I.; Lopez, L. C. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front. Biosci*, v. 12, p. 947-963, 2007.
- Al-Shabrawey, M.; Bartoli, M.; El-Remessy, A. B.; Ma, G.; Matragoon, S.; Lemtalsi, T.; Caldwell, R. W.; Caldwell, R. B. Role of NADPH Oxidase and Stat3 in statinmediated protection against diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, v. 49, p. 3231–3238, 2008.
- Alvarez-García, V.; González, A.; Alonso-González, C.; Martínezcampa, C.; Cos, S. Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. *J. Pineal. Res*, v. 54, n. 4, p. 373-380, 2013.
- Alves, A. P.; Santos, R. W. V.; Sobrinho, E. F. A.; Rocha, S. P. L.; Loch, A. C. N. Retinopatia em pacientes hipertensos e/ou diabéticos em uma unidade de saúde da família. *Rev. Bras. Oftalmol*, v.73, n. 2, p. 108-111, 2014.
- Anderson, O. A.; Bainbridg, J. W. B.; Shima, D. T. Delivery of anti-angiogenic molecular therapies for retinal disease. *Drug. Discov. Today*, v. 15, n. 7-8, p. 272-82, 2010.
- Anwar, M. M.; Meki, A. R. M. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol*, v. 135, p. 539–547, 2003.
- Arendt, J.; Skene, D. J. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep. Med. Rev*, v. 9, p. 25-39, 2005.

2665 Armstrong, D.; Al-Awadi, F. Lipid peroxidation and retinopathy in streptozotocin-induced
 2666 diabetes. *Free. Rad. Biol. Med*, v. 11, n. 4, p. 433–436, 1991.

2667 Attia, D. M.; Verhagen, A. M.; Stroes, E. S.; Van Faassen, E. E.; Gröne, H. J.; DE Kimpe, S.
 2668 J.; Koomans, H. A.; Braam, B.; Joles, J A. Vitamin E alleviates renal injury, but not
 2669 hypertension, during chronic nitric oxide synthase inhibition in rats. *J. Ame. Soc. Nephrol*, v.
 2670 12, p. 2585–93, 2001.

2671 Baydas, G.; Ercel, E.; Canatan, H.; Donder, E.; Akyol, A. Effect of melatonin on oxidative
 2672 status of rat brain, liver and kidney tissues under Constant light exposure. *Cell. Biochem.*
 2673 *Funct*, v. 19, p. 37-41, 2001.

2674 Bonnefont-Rousselot, D.; Collins, F. Melatonin: action as antioxidant and potential
 2675 applications in human disease and aging. *Toxicology*, v. 278, p. 55-67, 2010.

2676 BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção
 2677 Básica. *Cadernos de Atenção Básica* n. 16; 2006.

2678 Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, v.
 2679 414, p. 813-20, 2001.

2680 Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: Gleischer, S.; Packer, L., (Ed.)
 2681 *Methods in Enzimology*. New York: Academic Press, v. 52C, p. 302-310, 1978.

2682 Cam, M.; Yavuz, O.; Guven, A.; Ercan, F.; Bukan, N.; Ustündag, N. Protective effects of
 2683 chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J.*
 2684 *Pineal. Res*, v. 35, p. 212–220, 2003.

2685 Capellini, V. K.; Baldo, C. F.; Celotto, A. C.; Batalhão, M. E.; Cárnio, E. C.; Rodrigues, A. J.;
 2686 Evora, P. R. Oxidative stress is not associated with vascular dysfunction in a model of
 2687 alloxan-induced diabetic rats. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*, v. 54, n. 6, p. 530-539, 2010.

2688 Costa, E. J.; Lopes, R. H.; Lamy-Freund, M. T. Permeability of pure lipid bilayers to
 2689 melatonin. *J. Pineal. Res*, v. 19, n. 3, p. 123-126, 1995.

2690 Cipolla-Neto, J.; Afeche, S. C.; Glândula pineal in: Aires, M.M (Ed.). *Fisiologia*. 3. Ed. Rio
 2691 de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. p. 981-990.

2692 Dall'ago, P.; Silva, V. O. K.; DE Angelis, K. L. D.; Irigoyen, M. C.; Fazan, J. R.; Salgado, H.
 2693 C. Reflex controlo f arterial pressure and heart rat in short-term streptozotocin diabetic rats.
 2694 *Braz. J. Med. Biol. Res*, v. 35, p. 843-849, 2002.

2695 Ellis, E. A.; Grant, M. B.; Murray, F. T.; Wachowski, M. B.; Guberski, D. L.; Kubilis, P. S.;
 2696 Luty, G. A. Increased NADH oxidase activity in the retina of the BBZ/Wor diabetic rat. *Free*
 2697 *Rad. Biol. Med*, v. 24, p. 111–201, 1998.

2698 Erejuwa, O. O.; Sulaiman, S. A.; Wahab, M. S.; Sirajudeen, K. N.; Sallet, M. D.; Gurtu, S.
 2699 Antioxidant protection of Malaysian tualang honey In: pancreas of normal and streptozotocin-
 2700 induced diabetic rats. *Ann. Endocrinol*, v. 71, p. 291-296, 2010.

2701 Giacco, F.; Browlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Cir. Res*, v. 107, n. 9, p.
 2702 1058-1070, 2010.

2703 Grassi, G. G. Diabetic retinopathy. *Minerva. Med*, v. 94, p. 419–435, 2003.

2704 Gualtieri, M (2004). *Visão de cores e sensibilidade ao contraste em indivíduos com diabetes*
 2705 *melito: avaliação psicofísica e eletrofisiológica*. Dissertação de Mestrado, Instituto Psicologia,
 2706 Universidade de São Paulo, São Paulo.

2707 Guerrero, J. M.; Reiter, R. J. Melatonin-immune system relationships. *Curr. Top. Med.*
 2708 *Chem*, v. 2, p. 167-179, 2002.

2709 Guimaraes, H. C.; Gerenutti¹, M.; Alternativas terapêuticas para o tratamento da degeneração macular
 2710 relacionada à idade: um desafio para a saúde pública. Rev. Ciênc. Farm. Básica. Apl, v. 34, n. 4,p.
 2711 459-468, 2013.

2712 Guven, A.; Yavuz, O.; Cam, M.; Ercan, F.; Bukan, N.; Comunoglu, C.; Gokce, F. Effect of
 2713 melatonin on streptozotocin induced diabetic liver injury in rats. Acta Histochem, v. 108, n.
 2714 2, p. 85-93, 2006.

2715 Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. Free radicals in biology and medicine, 4 ed. Editora,
 2716 Oxford, 2007.

2717 Halliwell, B.; Guttridge, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 3 rd ed. New York:
 2718 Oxford, 1999.

2719 Kaur, C.; foulds, W. S.; Ling, E. A. “Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions:
 2720 basic concepts, clinical features and management,” Prog. Ret. Eye Res, v. 27, n. 6, p. 622–
 2721 647, 2008.

2722 Kaur, C.; Sivakumar, V.; Yong, Z.; Lu, J.; Foulds, W. S.; Ling, E. A. Blood-retinal barrier
 2723 disruption and ultrastructural changes in the hypoxic retina in adult rats: the beneficial effect
 2724 of melatonin administration. J. Pathol, v. 212, p. 429–439, 2007.

2725 Kowluru, R. A.; Chan, P. S.; “Oxidative stress and diabetic retinopathy,” Exp. Diab, v. 2007,
 2726 p. 12, 2007.

2727 Kowluru, R. A.; Engerman, R. L.; Kern, T. S. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes
 2728 or experimental galactosemia VI. Comparasion of retinal and cerebral cortex metabolism, and
 2729 effects of antioxidant therapy. Free. Rad. Biol. Med, v. 26, p. 371-378, 1999.

2730 Linden, R.; Perry, V. H. Massive retinotectal projection in rats. Brain. Res, v. 272, p. 145-
 2731 149, 1983.

2732 Maritim, A. C.; Sanders, R. A.; Watkins, J. B. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: A
 2733 diabetes, Oxidative stress, and Antioxidants: A Review. *Biochem. Mol. Toxicol*, v. 17, n.1, p.
 2734 24-38, 2003.

2735 Marmor, M. F.; Fulton, A. B.; Holder, G. E.; Miyake, Y.; Brigell, M.; BACH, M. ISCEV
 2736 Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Doc. Ophthalmol*, v. 118, p.
 2737 69-77, 2009.

2738 Mehmet, G.; Sinan, E.; Mukaddes, E.; Nigar, V. Protective Effects of Melatonin and
 2739 Aminoguanidine on the Cornea in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Cornea*, v. 27, n. 7,
 2740 p. 795-801, 2008.

2741 Miwa, K.; Nakamura, J.; Hamada, Y.; Naruse, K.; Nakashima, E.; Kato, K.; Kasuya, Y.;
 2742 Yasuda, Y.; Kamiya, H.; Hotta, N. "The role of polyol pathway in glucose-induced apoptosis
 2743 of cultured retinal pericytes," *Diabetes. Res. Clin. Prac*, v. 60, n. 1, p. 1–9, 2003.

2744 Moreno, A.; Lozano, M.; Salinas, P. Diabetic retinopathy. *Nutrición Hospitalaria*, v. 28, n. 2,
 2745 p. 53-56, 2013.

2746 Nagai, N.; Izumi-Nagai, K.; Oike, Y.; Koto, T.; Satofuka, S.; Ozawa, Y.; Yamashiro, K.;
 2747 Inoue, M.; Tsubota, K.; Umezawa, K.; Ishida, S. Suppression of diabetes-induced retinal
 2748 inflammation by blocking the angiotensin II type 1 receptor or its downstream nuclear factor-
 2749 kappaB pathway. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, v. 48, p.4342– 4350, 2007.

2750 Nixdorf, S. L.; Gutierrez, I. H. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar
 2751 Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. *Anal. Chim. Acta*, v. 659, p. 208-215,
 2752 2010.

2753 Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric
 2754 acid reaction. *Ann. Clin. Biochem*, v. 95, p. 351–358, 1979.

2755 Organização Mundial DA Saúde. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and
 2756 intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. WHO library Cataloguing-
 2757 in-publication Data, 2006.

2758 Osborne, N. N.; Nash, M. S.; Wood, J. P. Melatonin counteracts ischemia-induced apoptosis
 2759 in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, v. 12. n. 12, p. 2374-
 2760 2383, 1998.

2761 Ozguner, F.; Bardak, Y.; Comlekci, S. Protective effects of melatonin and caffeic acid
 2762 phenethyl ester against retinal oxidative stress in long-term use of mobile phone: A
 2763 comparative study. *Mol. Cell. Biochem*, v. 282, p. 83–88, 2006.

2764 Pandi-Perumal, S. R.; Srinivasan, V.; Maestroni, G. J.; Cardinali, D. P.; Poeggeler, B.;
 2765 Hardeland, R. Melatonin. *FEBS J*, v. 273, p. 2813-2838, 2008.

2766 Pappolla, M. A.; Sos, M.; Omar, R. A.; Bick, R. J.; Hickson-Bick, D. L. M.; Reiter, R. J.;
 2767 Efthimiopoulos, S.; Robakis, N. K. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed
 2768 to the Alzheimer amyloid peptide. *J. Neurosci*, v. 17, p. 1683–1690, 1997.

2769 Pereira Cem. Contensor mecânico para ratos. *Acta Cir Bras* [serial online]. 2001; 16(4).

2770 Picinato, M. C.; Hirata, A. E.; Cipolla-Neto, J.; Curi, R.; Carvalho, C. R. O.; Anhê, G. F.;
 2771 Carpinelli, A. R. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through
 2772 MT1 receptor in isolated rat pancreatic islet. *J. Pineal. Res*, v. 44, n. 1, p. 88-94, 2008.

2773 Pinheiro, L. S.; Melo, A. D.; Andreazzi, A. E. Protocol of Insulin Therapy For Streptozotocin-
 2774 Diabetic Rats Based on a Study of Food Ingestion and Glycemic Variation. *Scan. J. Lab.*
 2775 *Anim. Sci.* v. 38, n. 2, p. 145-152, 2011.

2776 Reiter, R. J.; Acuna-Castroviejo, D.; Tan, D. X.; Burkhardt, S. Free radical-mediated
 2777 molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous
 2778 system. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, v. 939, p. 200-215, 2001.

2779 Reiter, R. J.; Tan, D. X.; Korkmaz, A.; Rosales-Corral, S. A. Melatonin and stable circadian
 2780 rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum. Reprod. Update*, v. 20, n. 2,
 2781 p. 293-307, 2013.

2782 Reiter, R. J.; Tan, D. X.; Manchester, L. C.; Paredes, S. D.; Mayo, J. C.; Sainz, R. M.
 2783 Melatonin and reproduction revisited. *Biol. Reprod*, v. 81, p. 445-456, 2009.

2784 Saenz, D. A.; Goldin, A. P.; Mincses, L.; Chianelli, M.; Sarmiento, M. I.; Rosenstein, R. E.
 2785 Effect of melatonin on the retinal glutamate/glutamine cycle in the golden hamster retina.
 2786 *FASEB. J*, v. 18, p. 1912–1913, 2004.

2787 Schaan, B. D.; Silva, A. M. V.; Irigoyen, M. C. Disfunção endotelial no diabetes melito e
 2788 estados de resistência à insulina: papel do estresse oxidativo e potenciais oportunidades
 2789 terapêuticas. *Arq. Bras.Endocrinol. Metab*, v. 54, n. 6, p. 514-515, 2010.

2790 Sakai, H.; Tani, Y.; Shirasawa, E.; Shirao, Y.; Kawasaki, K. Development of
 2791 Electroretinographic Alterations in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Ophthalmic. Res*,
 2792 v. 27, p. 57–63, 1995.

2793 Sedlak, J.; Lindsay, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl
 2794 groups in tissue with Ellman's reagent. *Ann. Rev. Biochem*, v. 25, p.192-195, 1968.

2795 Seraphim, P.; Bartol, I.; Cipolla-Neto, J.; Machado, U. F. Quantification of GLUT-4
 2796 transporters in insulin sensitive tissues from pinealectomized rats. In: Webb, S.; Puig-
 2797 Domingo, M.; Moller, M.; Pévet, P. Pineal Uptade: from molecular biology to clinical
 2798 implications. New York: PDJ Publications Limited, 1997. p. 99-106.

2799 Shimaa, T.; Chuna, S. J.; Nijimab, A.; Bizot-Espiardc, J.; Guardiola-Lemaitrec, B.;
 2800 Hosokawaa, M.; Nagai, K. Melatonin suppresses hyperglycemia caused by
 2801 intracerebroventricular injection of 2-deoxy-d-glucose in rats. *Neurosci. Lett*, p. 119-122,
 2802 1997.

2803 Siu, A. W.; Maldonado, M.; Sanchez-Hidalgo, M.; Tan, D. X.; Reiter, R. J. Protective effects
 2804 of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. *J. Pineal. Res*, v. 40, p. 101–
 2805 109, 2006.

2806 Sudnikovich, E. J.; Maksirachik, Y. Z.; Zabrodskaia, S. V.; kubyshin, V. L.; Lapshina, E. A.;
 2807 Bryszewska, M.; Reiter, R. J.; Zavodnik, I. B. Melatonin attenuates metabolic disorders due
 2808 to streptozotocininduced diabetes in rats. *Eur. J. Pharmacol*, v. 569, n. 3, p.180–187, 2007.

2809 Tabit, C. E.; Chung, W. B.; Hamburg, N. M.; Vita, J. A. Endothelial dysfunction in diabetes
 2810 mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Ver. Endocr. Metab. Disord*, v. 11,
 2811 n. 1, p. 61-74, 2010.

2812 Teixeira, A. A. C.; Simões, M. J.; Wanderley-Teixeira, V.; Junior, S.; Maria, J. Evaluation of
 2813 the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. *Int. J.*
 2814 *Morphol*, v. 22, n. 3, p.189-94, 2004.

2815 Teixeira, A. Propriedades antioxidantes da melatonina: Inibição de enzimas pró-oxidantes e
 2816 ação contra a peroxidação lipídica. 2003. 85p. Dissertação (Mestrado em Neurociências e
 2817 Comportamento) - Centro de Ciências biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina,
 2818 Florianópolis, 2003.

2819 Wang, J.; Xiao, X.; Zhang, Y.; Shi, D.; Chen, W.; Fu, L.; Liu, L.; Xie, F.; Kang, T.; Huang,
 2820 W.; Deng, W. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by

2821 melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. *J. Pineal Res*, v.
2822 53, p. 77-90, 2012.

2823 Yavuz, O.; Cam, M.; Bukan, N.; Guven, A.; Silan, F. Protective effect of melatonin on cell
2824 damage in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Acta. histochem*, v. 105, n. 3, p. 261–63,
2825 2003.

2826 Zhang, L.; Zalewski, A.; Liu, Y.; Mazurek, T.; Cowan, S.; Martin, J. L.; Hofmann, S. M.;
2827 Vlassara, H.; Shi, Y. Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in
2828 porcine coronary arteries. *Circulation*, v. 108, p. 472– 478, 2003.

2829

2830

2831

2832

2833

2834

2835

2836

2837

2838

2839

2840

2841

2842

2843

2844

2845

Tabela 1. Média $\pm$ desvio-padrão dos níveis de plasmáticos de glicose (mg/dL). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético tratado com melatonina; GDMS – grupo diabético tratado com melatonina simultaneamente; GDI – grupo diabético tratado com insulina.

Grupos	Antes da indução do diabetes	Após indução do diabetes (7º dia)	Meio do tratamento (10º dia)	Fim do tratamento (20º dia)
GC	95,40 $\pm$ 3,44aA	96,01 $\pm$ 4,55bA	99,21 $\pm$ 1,09cA	102,77 $\pm$ 5,84cA
GD	94,89 $\pm$ 1,11aC	350,16 $\pm$ 7,61aB	395,19 $\pm$ 9,15aA	401,43 $\pm$ 1,98aA
GDM	97,12 $\pm$ 2,94aC	345,92 $\pm$ 5,22aB	399,70 $\pm$ 4,09aA	406,17 $\pm$ 8,12aA
GDMS	101,43 $\pm$ 3,67aC	349,33 $\pm$ 8,01aA	317,30 $\pm$ 3,99bB	314,75 $\pm$ 4,91bB
GDI	96,72 $\pm$ 2,04aB	347,83 $\pm$ 6,66aA	99,60 $\pm$ 1,88cB	91,50 $\pm$ 7,89cB
P	0,0654	0,0012	0,0155	0,0453

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas entre os grupos e maiúsculas ao longo do tratamento não diferem entre si de acordo com o teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). Coluna: grupos experimentais e Linhas: tratamentos

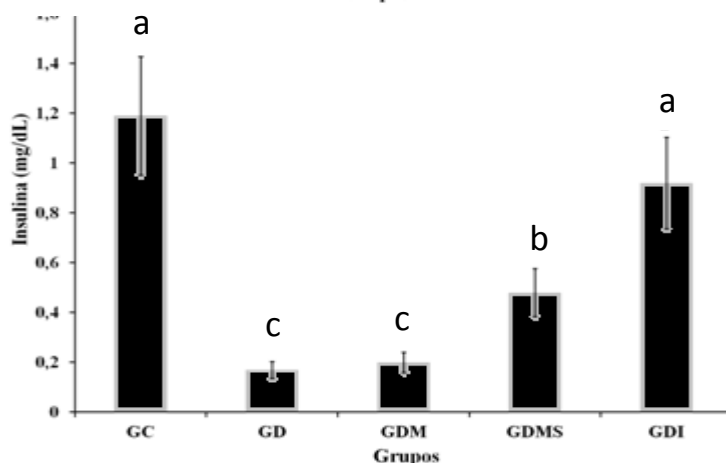
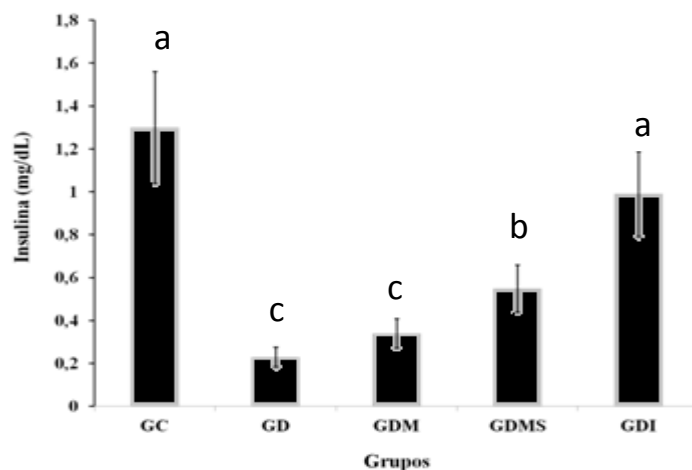
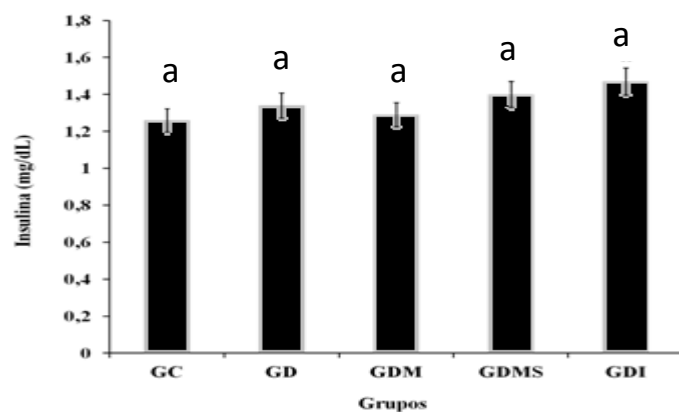


Figura 4. Níveis plasmáticos do hormônio insulina (mg/dL). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético tratado com melatonina; GDMS – grupo diabético tratado com melatonina simultânea; GDI – grupo diabético tratado com insulina. **A-** grupos experimentais antes da indução; **B-** grupos experimentais com 10 dias das administrações; **C-** grupos experimentais com 20 dias das administrações. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

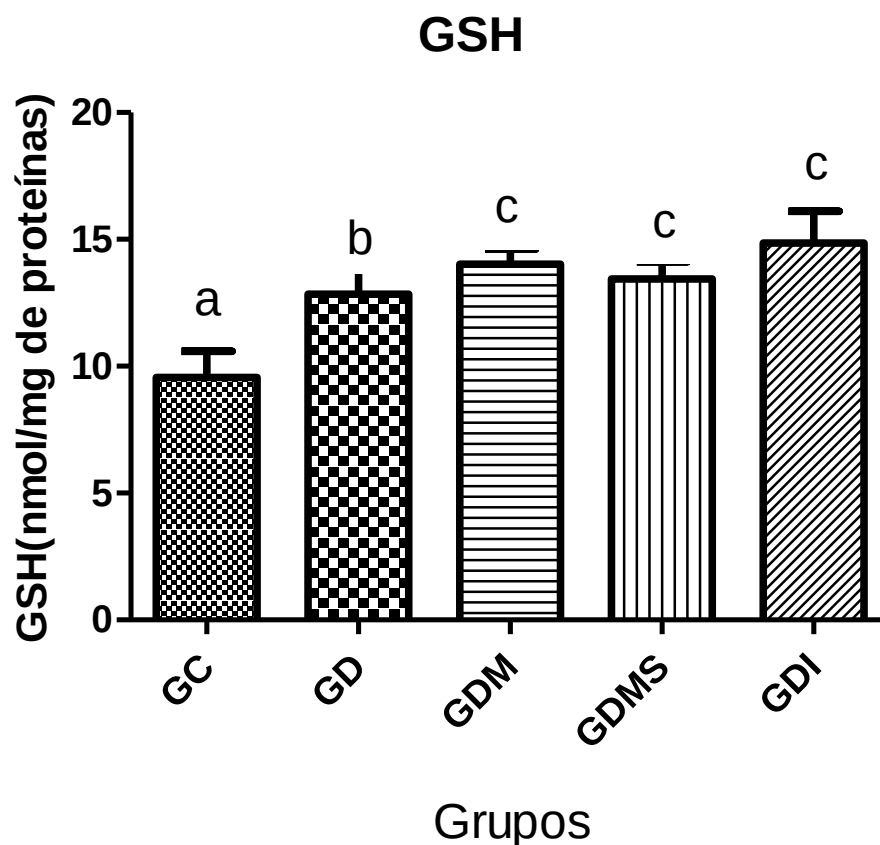


Figura 5. Gráfico dos valores de GSH no pâncreas dos animais nos diferentes grupos experimentais (nmol/mg de proteína). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético tratado com melatonina; GDMS – grupo diabético tratado com melatonina simultânea; GDI – grupo diabético tratado com insulina. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

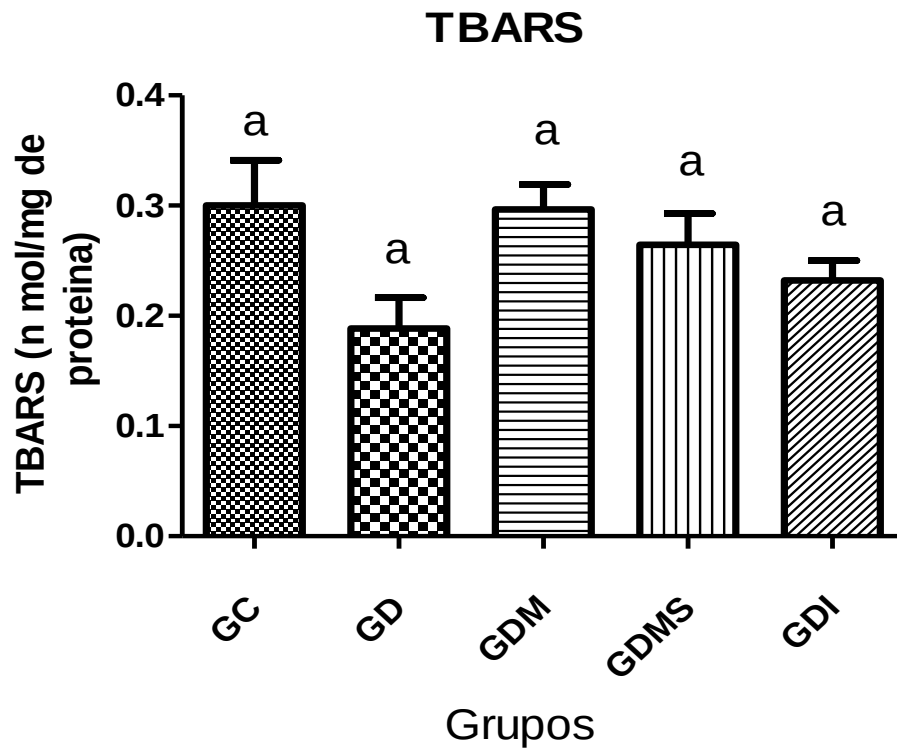
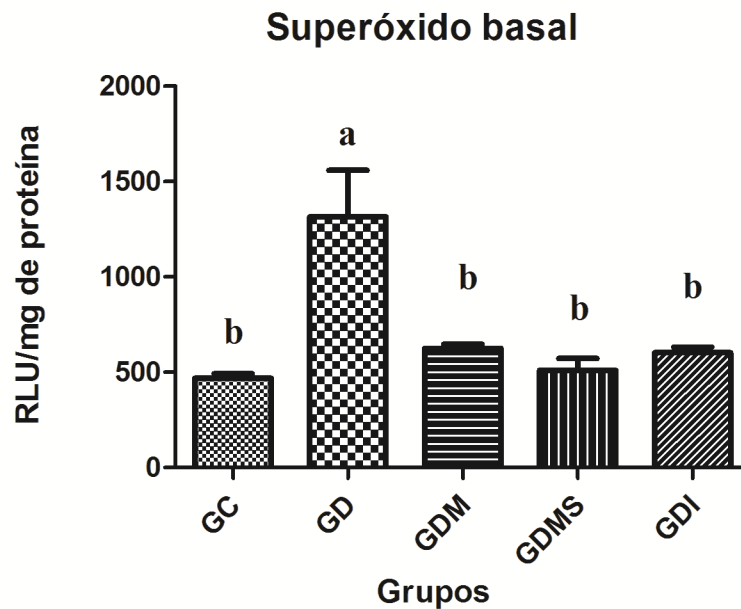
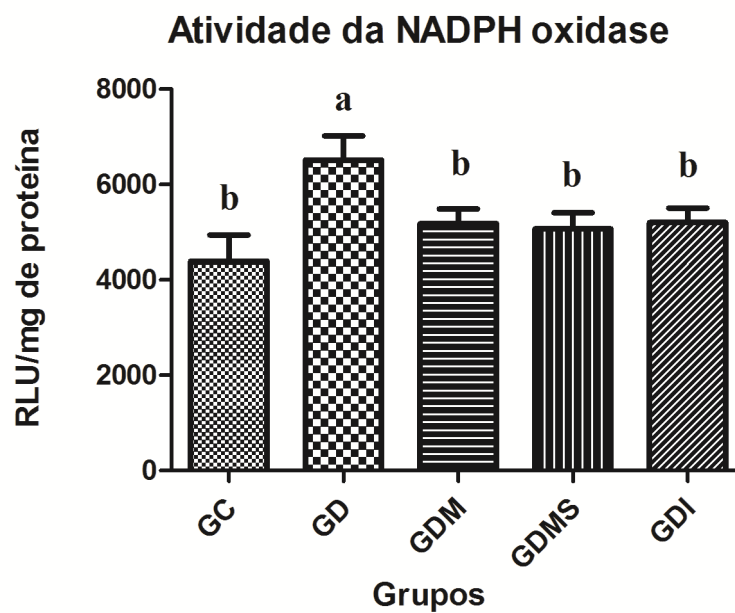


Figura 6. Gráfico dos valores de TBARS no pâncreas dos animais nos diferentes grupos experimentais (nmol/mg de proteína). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).



A



B

Figura7: Gráfico dos valores de Superóxido basal (A) e Atividade da NADPH oxidase na retina dos animais nos diferentes grupos experimentais (RLU/mg de proteína). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético tratado com melatonina; GDMS – grupo diabético tratado com melatonina simultaneamente; GDI – grupo diabético tratado com insulina. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)

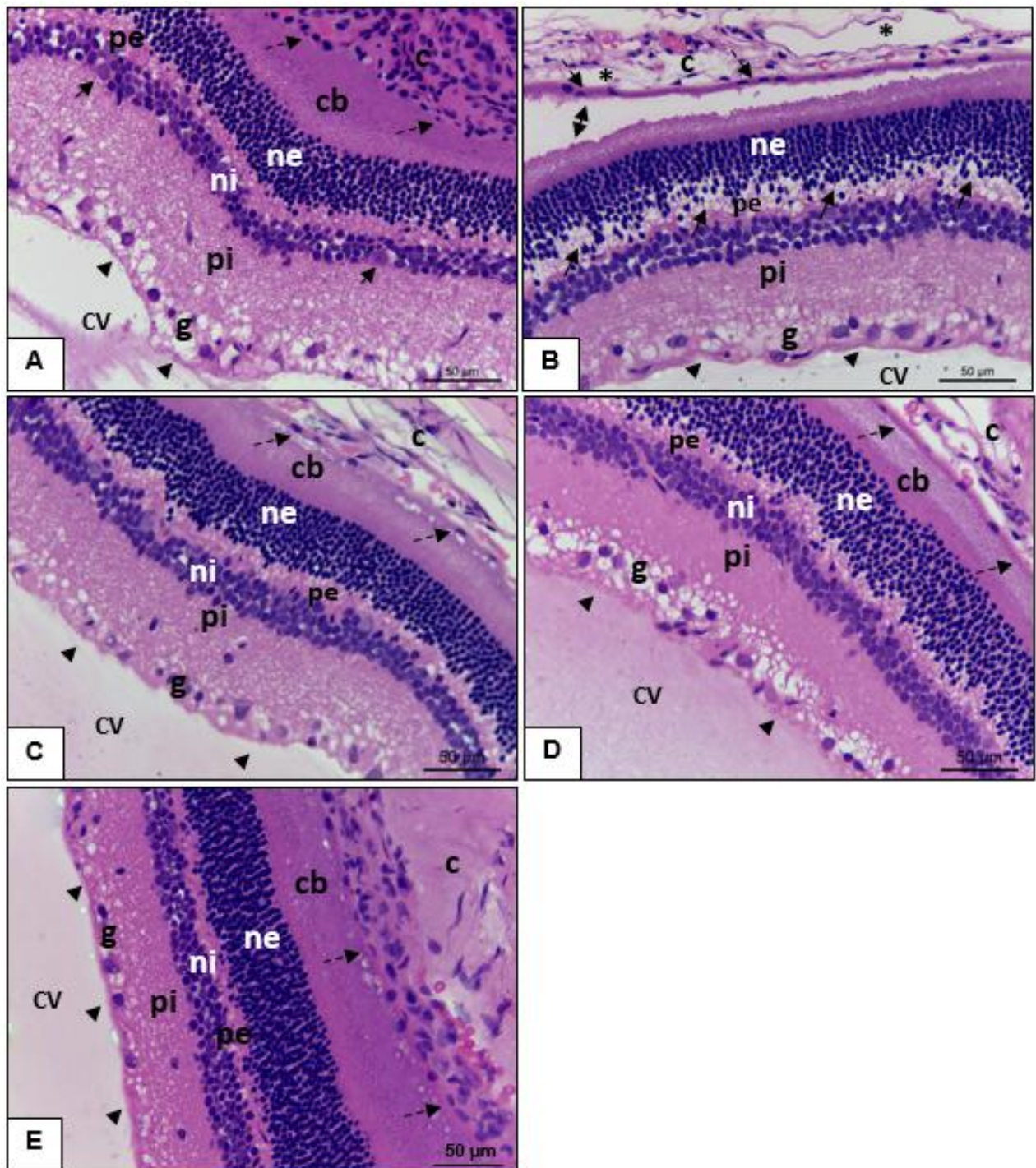


Figura 8: Nas fotomicrografias são demonstradas as camadas da retina, tomando como referência inicial a porção interna do lado esquerda, adjacente ao corpo vítreo (CV). Assim, a análise histopatológica de amostras de retina de ratos do grupo controle (Fig. A) revelou a presença de estruturas bem preservadas como a membrana limitante interna (cabeça de seta), camada de células ganglionares (g), células amácrinas (setas curtas), camada plexiforme interna (pi), nuclear interna (ni), camada plexiforme externa (pe), camada nuclear externa (ne), camada de bastonetes e cones (bc), epitélio pigmentar (setas tracejadas) e coróide (c). Após exposição à estreptozotocina GD (Fig. B) observou-se desorganização da camada nuclear externa (ne) e plexiforme externa (pe), com presença de inúmeros vacúolos (setas longas), deslocamento seroso da retina (dupla seta) e vasos sanguíneos dilatados (asterisco) quadro típico de retinopatia diabética. Porém, após o tratamento com insulina (Fig. C) e melatonina (Fig. D) observou-se menor progressão da retinopatia diabética. Verificou-se, ainda, que no grupo tratado com melatonina simultaneamente (Fig. E) houve melhor preservação da retina.

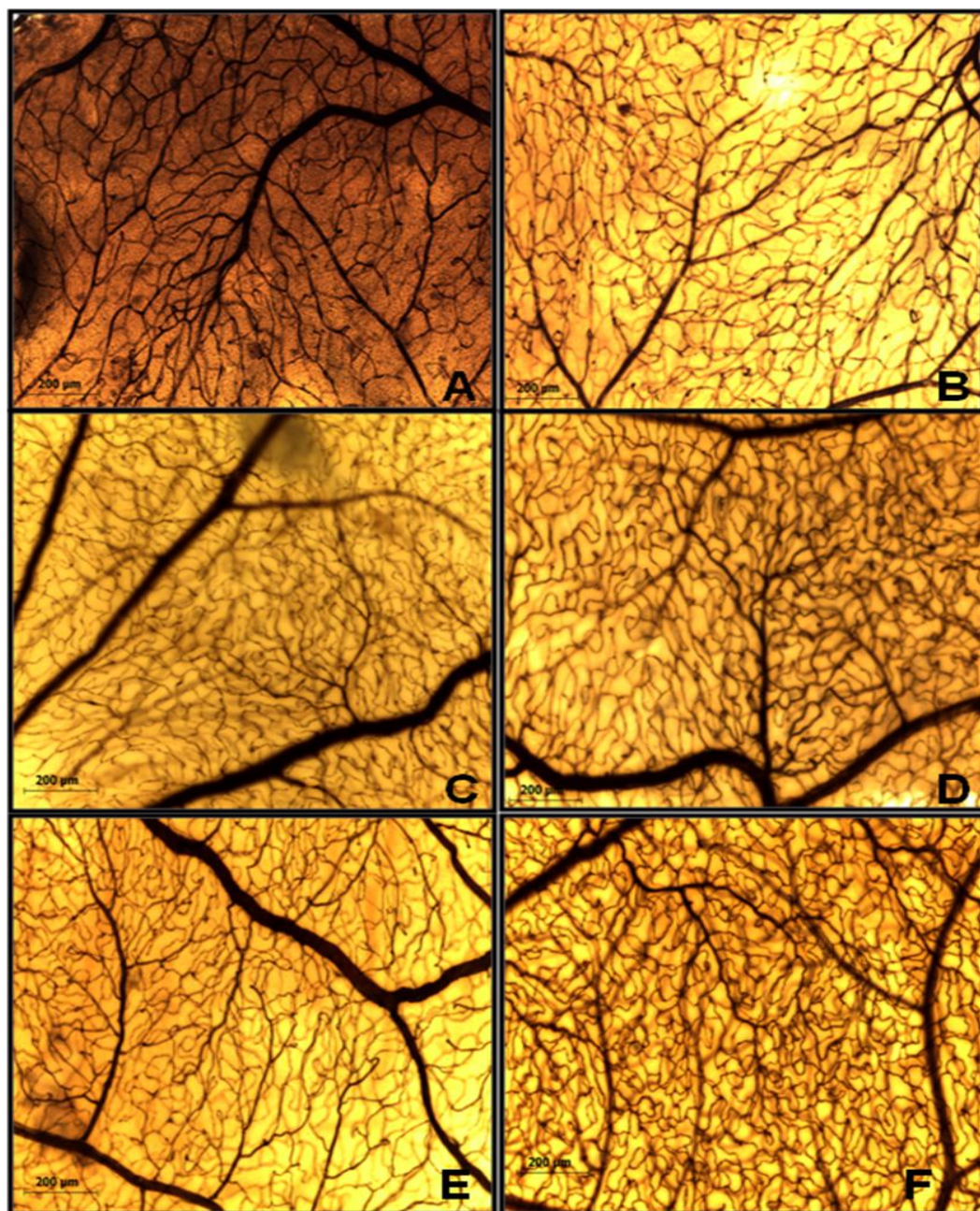


Figura 9: Fotomicrografia dos vasos da retina dos grupos experimentais. Observar uniformização do padrão vascular entre os grupos experimentais. Figura A e B (grupo controle), Figura C (grupo diabético), Figura D (grupo diabético tratado com melatonina) e Figura E (grupo diabético tratado com melatonina simultaneamente) e Figura F (grupo diabético tratado com insulina).

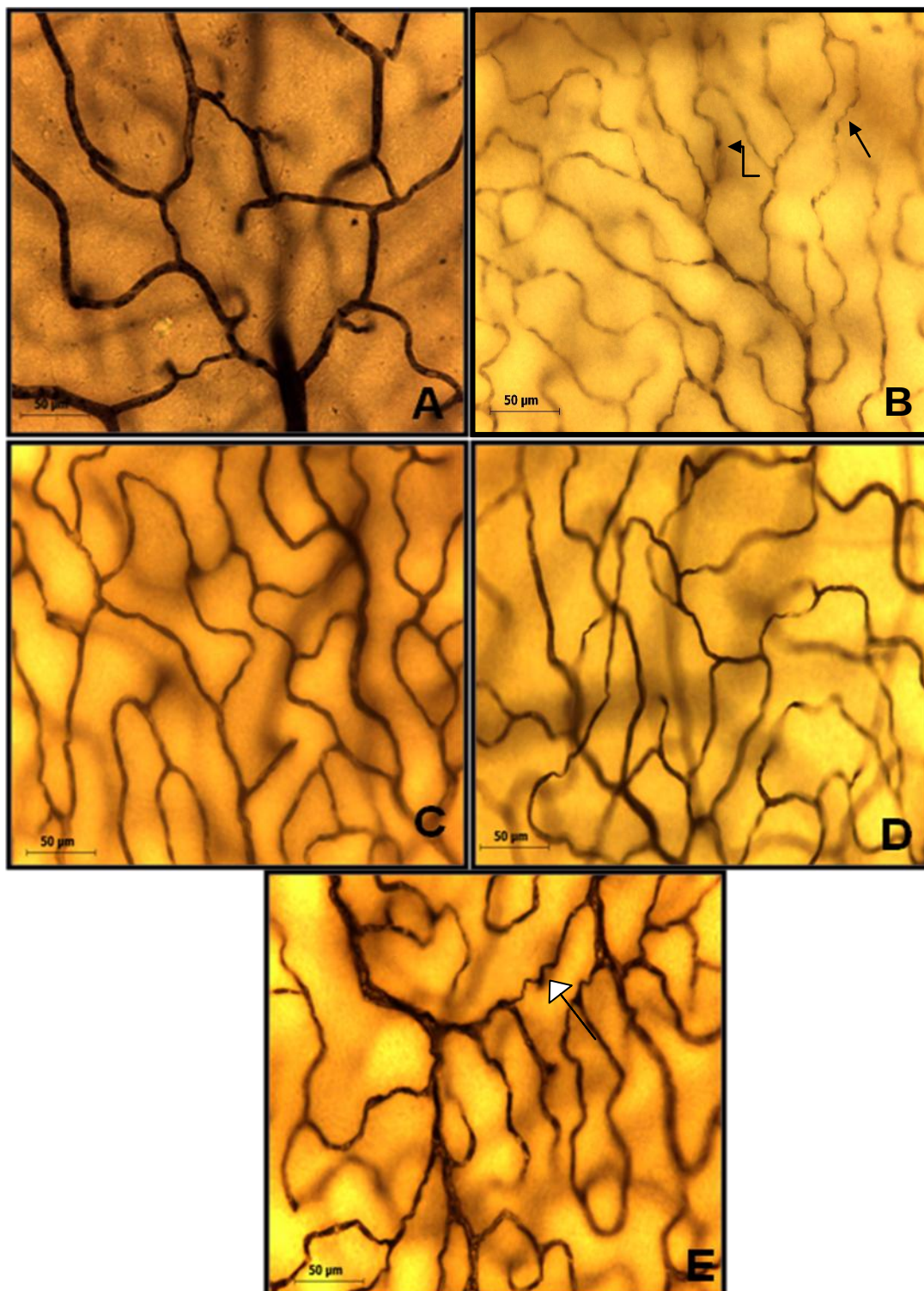


Figura 10: Fotomicrografia dos vasos da retina dos grupos experimentais. Observar presença de microaneurismas (seta preta) e tortuosidades (seta com cabeça branca) nos vasos da retina do grupo diabético Figura B e do grupo insulina Figura E. Observar atenuação desses fatores no grupo tratado com melatonina Figura C e no grupo tratado com melatonina simultânea Figura D.

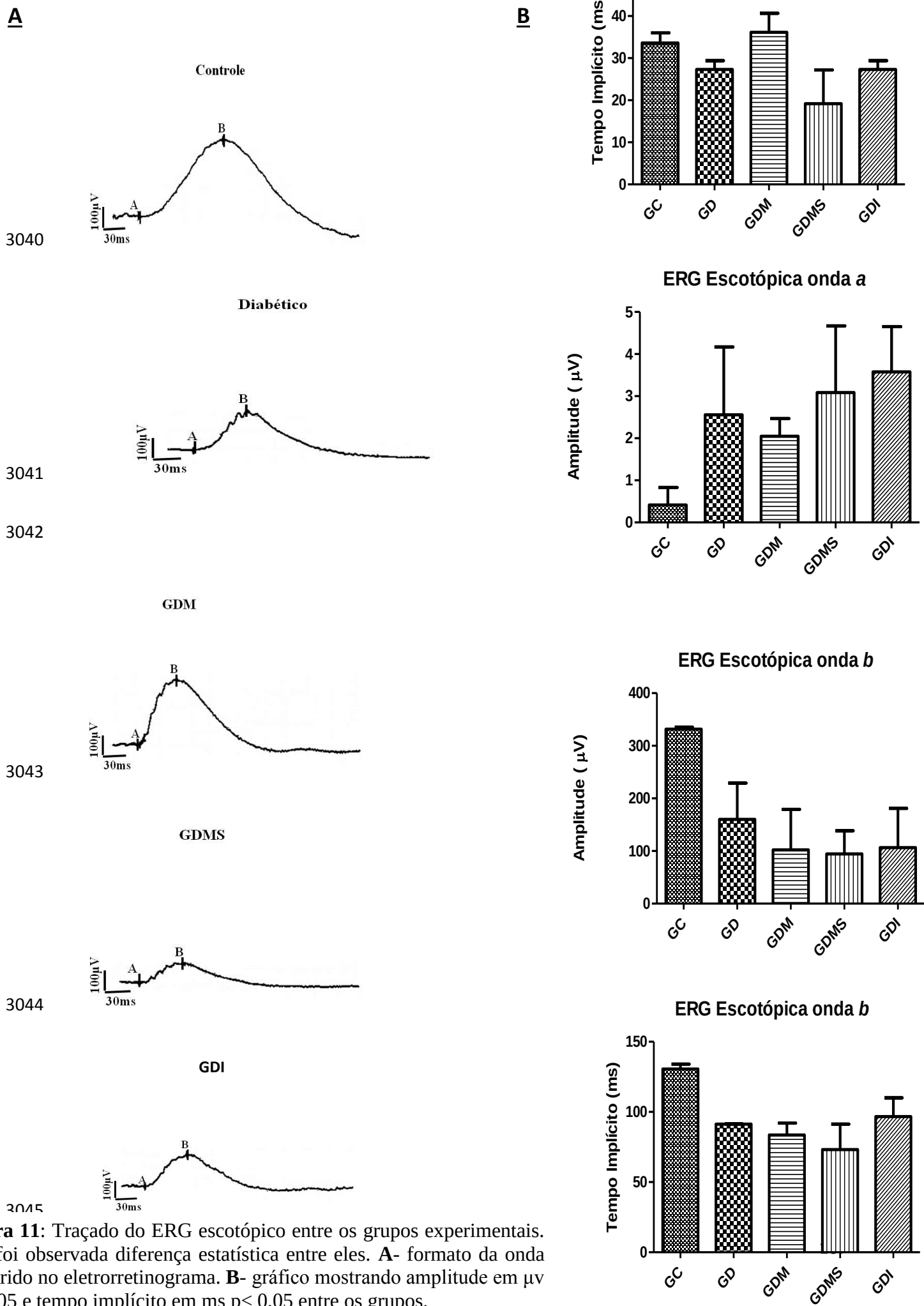
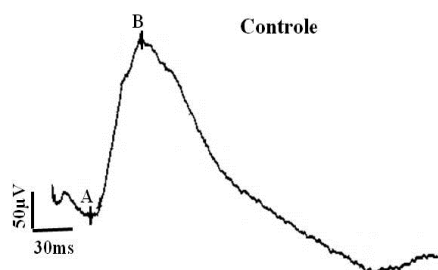
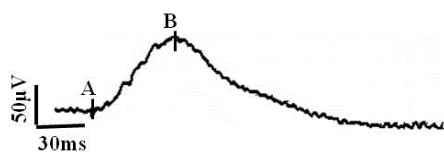


Figura 11: Traçado do ERG escotópico entre os grupos experimentais. Não foi observada diferença estatística entre eles. **A-** formato da onda adquirido no eletroretinograma. **B-** gráfico mostrando amplitude em μV $p < 0,05$ e tempo implícito em ms $p < 0,05$ entre os grupos.

A

3046

Diabético

3047

GDM

3048

GDMS

3049

GDI

3050

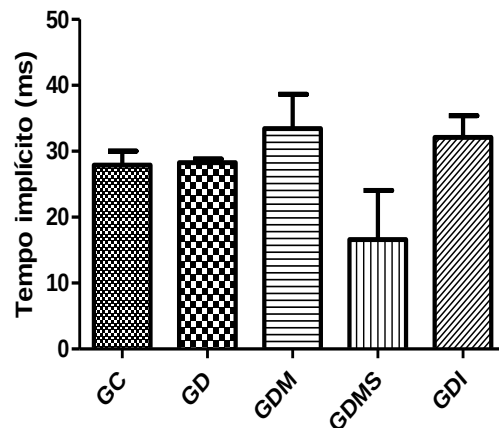
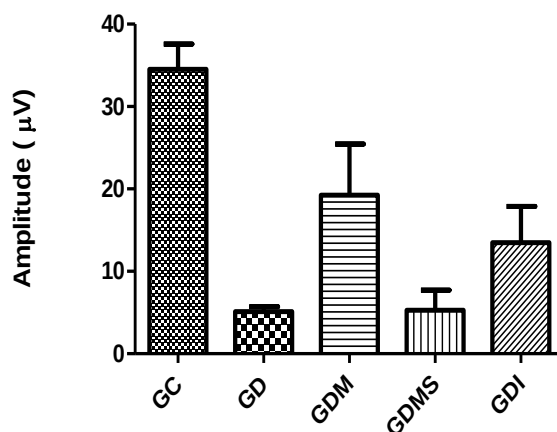
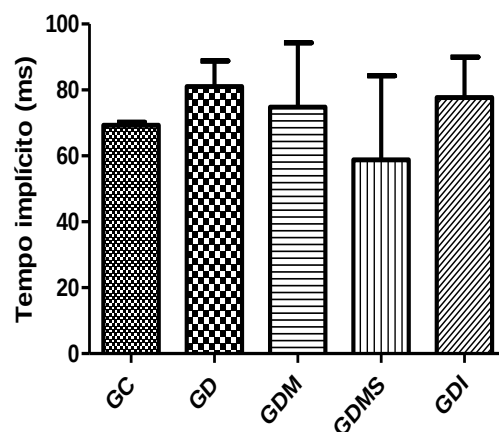
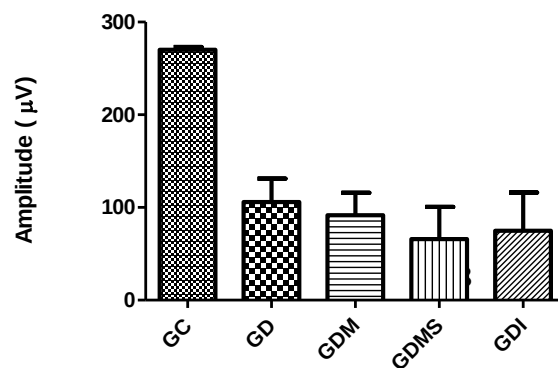
B**ERG Fotópico onda a****ERG Fotópico onda a****ERG Fotópico onda b****ERG Fotópico onda b**

Figura 12: Traçado do ERG fotópico entre os grupos experimentais. **A-** formato das ondas adquiridas pelo eletrorretinograma dos grupos. Não foi observada diferença estatística entre eles. **B-** gráfico mostrando amplitude em μV $p < 0,05$ e tempo implícito em ms $p < 0,05$ entre os grupos.

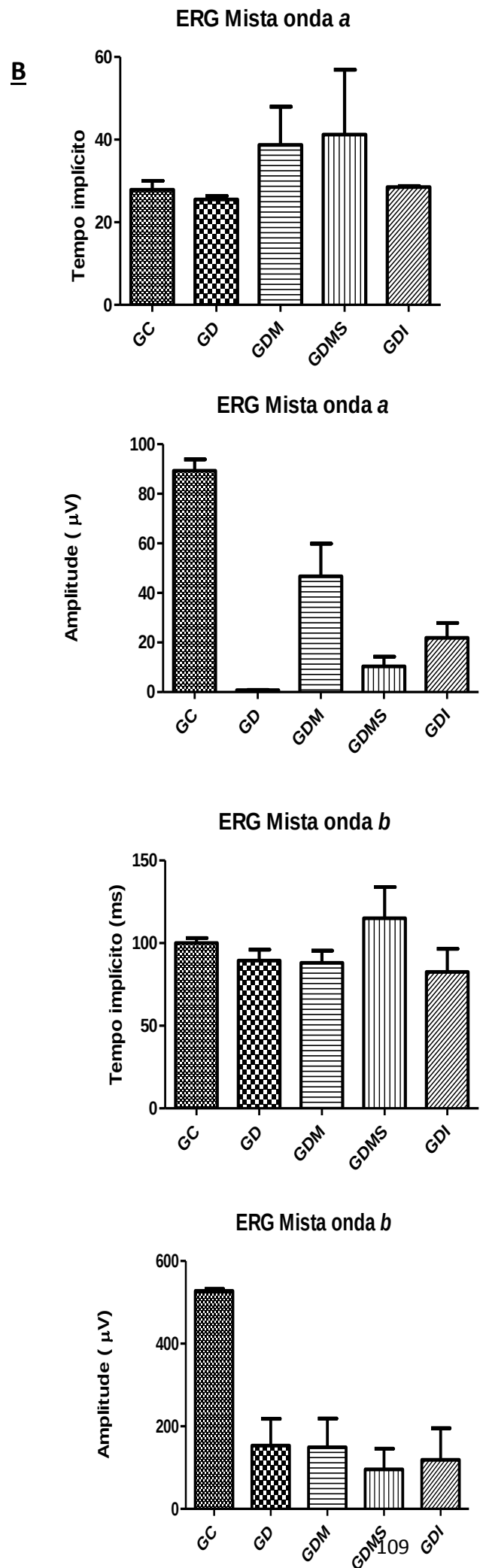
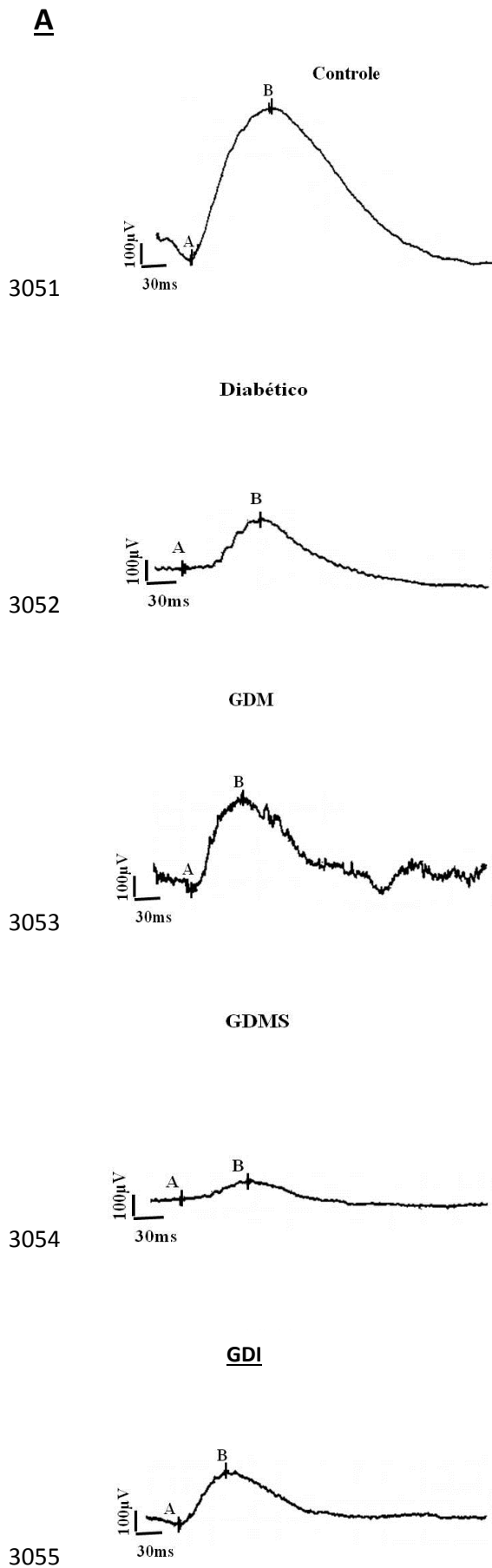


Figura 13: Traçado do ERG escotópico misto dos grupos experimentais. **A-** formato da onda adquirido no eletroretinograma. Foi observada diferença estatística na amplitude da onda *a* entre o GC e o GD. **B-** gráfico mostrando amplitude em µV $p < 0,05$ e tempo implícito em ms $p < 0,05$ entre os grupos.

3056

A

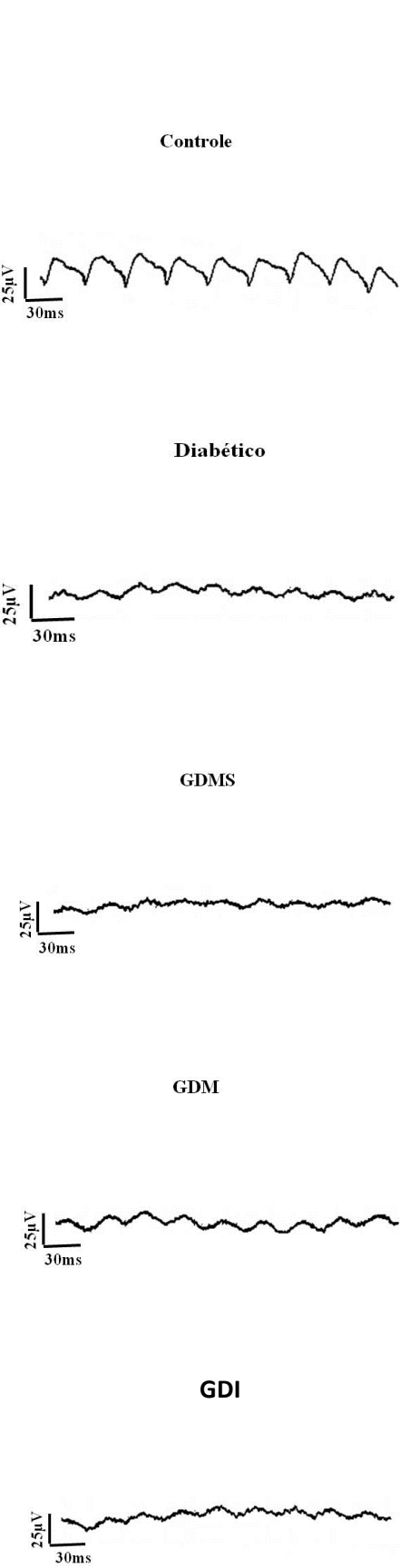
3058

3059

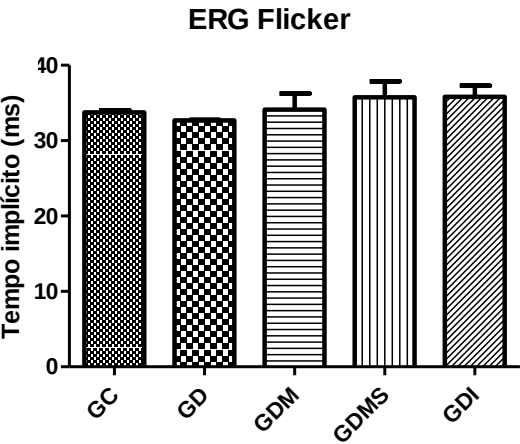
3060

3061

3062



B



C

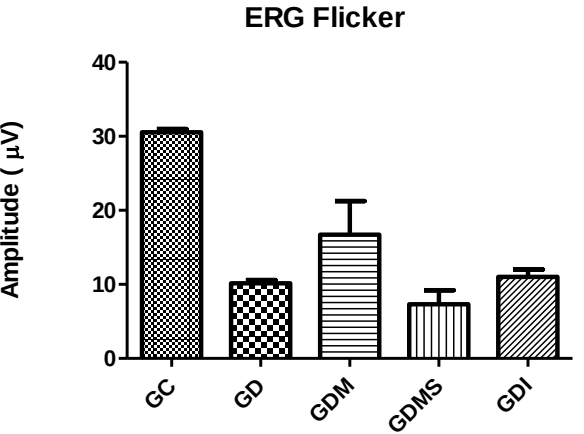


Figura 14: Traçado do ERG flicker dos animais dos grupos experimentais. **A-** formato das ondas adquiridas pelo eletrorretinograma dos grupos. **B –** Tempo Implícito do Flicker, em ms.– Amplitude do Flicker, em µV. *p< 0,05.

CAPÍTULO III

Melatonina regula expressão de citocinas inflamatórias, VEGF e apoptose em ratos com retinopatia diabética

Ismaela Maria Ferreira de Melo¹, Cíntia Giselle Martins Ferreira¹, Solange Bezerra da Silva¹,
Lecio Leone Almeida¹, Fabrício Bezerra de Sá¹, Valéria Wanderley Teixeira¹, Álvaro Aguiar
Coelho Teixeira^{1*}

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
Animal, Recife, Brasil

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois
Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389
E-mail: teixeira.alvaro@outlook.com (TEIXEIRA, A.A.C.)

Resumo: A presente pesquisa analisou se a melatonina seria capaz de mediar à expressão de VEGF, IL-6 e TNF- α , além do índice apoptótico em ratos com retinopatia diabética. Utilizou-se 50 ratos albinos da linhagem Wistar, divididos nos seguintes grupos: **GC:** ratos sem indução ao diabetes pela estreptozotocina; **GD:** ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com placebo; **GDM:** ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e após confirmação do diabetes tratados com melatonina na dosagem de 10mg/kg de peso corporal durante 20 dias; **GDMS:** ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e simultaneamente tratados com melatonina na dosagem de 10mg/kg durante 20 dias; **GDI:** ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e após confirmação do diabetes tratados com insulina durante 20 dias. O diabetes foi induzido pela administração intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg), e a insulina (5 U/dia) foi administrada via subcutânea. Para apoptose foi utilizado TUNEL e para a análise imunohistoquímica foram utilizados anticorpos da Santa Cruz Biotechnology. Os resultados mostraram que os grupos que foram tratados com melatonina e principalmente aqueles que receberam esse hormônio simultaneamente diminuíram a expressão das citocinas e do VEGF, além da apoptose. Assim, conclui-se que a melatonina pode regular a expressão desses fatores melhorando a condição da retina na retinopatia diabética.

Palavras-chave: Apoptose, citocinas, melatonina, ratos, retinopatia diabética

Abstract: This study examined whether melatonin would be able to mediate the expression of VEGF, IL-6 and TNF- α , in addition to the apoptotic index in rats with diabetic retinopathy. We used 50 albino Wistar rats were divided into the following groups: GC: no induction mice diabetes by streptozotocin; GD: rats induced by streptozotocin diabetes and treated with placebo; GDM: rats by streptozotocin induced diabetes mellitus and after confirmation treated with melatonin at a dose of 10mg / kg body weight for 20 days; GDMS: mice induced by streptozotocine diabetes and simultaneously treated with melatonin at a dose of 10mg / kg for 20 days; GDI: rats by streptozotocin induced diabetes mellitus and after confirmation treated with insulin for 20 days. Diabetes was induced by intraperitoneal administration of streptozotocin (60 mg / kg) and insulin (5 U / day) was administered subcutaneously. For apoptosis was used TUNEL and immunohistochemistry were used antibodies from Santa Cruz Biotechnology. The results showed that the groups treated with melatonin, and especially those receiving hormone that both decreased expression of VEGF and cytokines, as well as apoptosis. Thus, it is concluded that melatonin can regulate the expression of these factors improving retinal condition in diabetic retinopathy.

Keywords: apoptosis, cytokines, melatonin, mice, diabetic retinopathy

1. Introdução

Sabe-se que no diabetes, os níveis de citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas no vítreo e na retina (KOWLURU; ODENBACH 2004) e que a regulação positiva de vários fatores, tanto angiogênicos quanto inflamatórios, tem sido relacionados com a patogênese da retinopatia diabética (RD) (AIELLO 2005).

Os processos fisiológicos de reparo que auxiliam as células retinianas a sobreviverem ao estresse incluem a liberação aumentada de diversos fatores de crescimento e citocinas, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), IGF-1, interleucinas-1 e fator de necrose tumoral (TNF) (SERRARBASSA; DIAS; VIEIRA, 2008). Estas proteínas que têm sido implicadas no desenvolvimento da RD, também provêm funções neurotróficas para apoiar a sobrevivência das células da retina (GARIANO; GARDNER, 2005). O aumento da liberação de citocinas pode servir como uma função adaptativa para manter a função neuronal mas, ao mesmo tempo se a liberação for exagerada, causa dano vascular progressivo resultando em edema de mácula e neovascularização (GARIANO; GARDNER, 2005). Assim, este ciclo vicioso perpetua tanto o dano vascular como o neural e culmina nas características clínicas da RD (ANTONETTI et al., 2006).

O Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um composto que, sob condições de hipóxia ou de isquemia estimula o aumento da vasculatura, ele desempenha um papel central no aumento da permeabilidade vascular e angiogênese, enquanto que os fatores inflamatórios, como as interleucinas, o fator de necrose tumoral (TNF), e as angiopoietinas (Ang-2), têm sido relacionados com as vias fisiopatológicas que conduz a retinopatia diabética proliferativa (RANGASAMY; McGUIRE; DAS 2012).

Noma et al. (2002) explanaram que pacientes com diabetes mellitus e retinopatia diabética apresentaram maiores níveis de VEGF no humor aquoso e vítreo comparado com o do plasma, o que está relacionado com a atividade desta enfermidade. Além disso, pesquisas mostraram maior ativação leucocitária na retina de ratos diabéticos (MOTTA; COBLENTZ; MELO 2008).

Estudos também têm demonstrado significante aumento nas concentrações de IL-6 e TNF- α em pacientes com retinopatia diabética progressiva. Estas observações confirmam a natureza inflamatória e imunológica da fisiopatologia dessa enfermidade (GOLOGORSKY; THANOS; VAVVAS, 2012).

Diversos estudos sugerem que o diabetes causa uma perda crônica de neurônios na retina pelo aumento da frequência de apoptose (KERRIGAN et al., 1997; MIZUTANI; KERN; LORENZI 1996). Portanto, o aumento da apoptose na retina é um componente da retinopatia diabética (SERRARBASSA; DIAS; VIEIRA 2008). O Mecanismo pelo qual o estresse oxidativo pode aumentar a apoptose parece ser complexo, mas poderia envolver o aumento da peroxidação lipídica na membrana, injúria oxidativa de macromoléculas essenciais para a função celular e alterações no sinal de transdução e expressão gênica (MATSURA et al., 1999).

A avaliação das relações entre diabetes, metabolismo da glicose, e os efeitos da melatonina é um tema de grande interesse (DERLACZ et al., 2005). Foi sugerido que tratamentos com antioxidantes podem ser uma importante opção terapêutica na prevenção das complicações vasculares causadas pelo diabetes (BONJUGA et al., 2004). A proteção antioxidante da melatonina já foi demonstrada tanto *in vivo* como *in vitro* ao nível de membrana celular, mitocôndrias e núcleo (REITER, 2000). Além de suas ações como um eliminador de radicais livres, ela também estimula enzimas antioxidantes, como por exemplo

a superóxido dismutase a glutational peroxidase e a glutational redutase, o que promove ainda mais a sua capacidade de reduzir a toxicidade dos radicais livres e dos seus reagentes associados (REITER et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2004). Pesquisas mostraram que melatonina poderia restaurar o status antioxidante prejudicado em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (ANWAR; MEKI, 2003). Assim, sua administração à longo prazo reduziu a hiperlipidemia e a hiperinsulinemia e restaurou a relação dos ácidos graxos poliinsaturados no soro e tecidos de ratos diabéticos (NISHIDA, 2005).

Desta forma, os processos fisiológicos de reparo que auxiliam as células da retina a sobreviverem ao estresse incluem a liberação exacerbada de diversos fatores de crescimento e citocinas (GARIANO; GARDNER 2005). No entanto, o aumento da liberação dessas proteínas pode servir para manter a função neural, mas, se não equilibrada pode causar edema de mácula e neovascularização, perpetuando tanto o dano vascular como o neural (ANTONETTI et al., 2006). Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar se a melatonina exógena quando administrada simultaneamente a indução ao diabetes ou após sua confirmação, poderia diminuir os danos causados por essas citocinas além de atenuar ou mesmo evitar o processo apoptótico devido as suas propriedades antioxidantes, imunomoduladora e anti-apoptótica

2. Materiais e Métodos

Foram utilizados 50 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, com 90 dias de idade, pesando em torno de 300 ± 30 g, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para isto, este projeto foi submetido ao comitê de ética institucional e aprovado sob número de

protocolo 23082.022.699/2013 e licença N° 011/2014. Esses animais foram mantidos em gaiolas, com alimentação e água *ad libitum*, na temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação artificial que estabeleceram um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 06:00 às 18:00 h. Os animais foram divididos ao acaso em 5 grupos, cada um com 10 animais: **GC**: ratos sem indução ao diabetes pela estreptozotocina; **GD**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com placebo; **GDM**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e após confirmação do diabetes tratados com melatonina na dosagem de 10 mg/kg de peso corporal durante 20 dias; **GDMS**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e simultaneamente tratados com melatonina na dosagem de 10 mg/kg de peso corporal durante 20 dias; **GDI**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e após confirmação do diabetes tratados com insulina durante 20 dias.

2.1 Indução do diabetes

O diabetes foi induzido pela administração intraperitoneal de solução de estreptozotocina (Sigma Chemical Co., USA) após jejum alimentar de 14 horas e confirmado no sétimo dia após a aplicação. A estreptozotocina foi diluída em tampão citrato de sódio a 10 mM e pH 4,5, na dosagem única de 60 mg/kg de peso do animal. Os animais não diabéticos (grupo controle) receberam da mesma forma, doses equivalentes de solução salina e decorridos 30 minutos da administração todos os animais foram alimentados normalmente (DALL'AGO et al., 2002). Foram incluídos no estudo apenas animais que apresentaram glicose sanguínea acima de 200 mg/dL (Glicosímetro Kit Accu-Chek Activ), exceto do grupo controle, para início do tratamento com a melatonina ou insulina.

2.2 Administração da melatonina

A administração da melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi realizado por meio de injeções subcutânea no início da noite (18:00) durante 20 dias (GUVEN et al., 2006) na dosagem de 10 mg/kg (SUDNIKOVICH et al., 2007). A melatonina foi dissolvida em etanol e diluída em salina na proporção de 1:9 (OZGUNER; BARDAK; COMLEKCI 2006).

2.3 Administração de insulina

A insulina foi administrada por via subcutânea durante 20 dias, na dose de 5 U/dia, sendo duas unidades de insulina às 10 h e 3 unidades restantes às 19 h (PINHEIRO et al., 2011).

2.4 Imunohistoquímica (IL6, TNF- α , VEGF)

Para análise imunohistoquímica, as lâminas foram desparafinizadas e reidratadas em xilol e alcoóis. A recuperação antigênica foi realizada através de uma solução de tampão citrato (pH 8.0) em alta temperatura no microondas por 5 minutos. A peroxidase endógena foi inibida através de uma solução de peróxido de hidrogênio (3%) em metanol. A reação antígeno-anticorpo inespecífica foi bloqueada através da incubação das lâminas em PBS e albumina sérica bovina (BSA) 5% durante uma hora. Todos os anticorpos (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) foram diluídos em PBS/BSA 1% por uma hora.

Subsequentemente, as lâminas foram tratadas com o anticorpo secundário por trinta minutos. A reação antígeno-anticorpo foi observada através de um precipitado marrom após aplicação de 3,3 diaminobenzidina por quatro minutos e contracolorados com hematoxilina. As imagens foram capturadas por meio de câmera de Vídeo Sony[®], acoplada ao microscópio Olympus[®] Bx50, as quais foram submetidas ao aplicativo Gimp 2.0 para a quantificação por meio de Histograma RGB (Red-Green-Blue), o qual se baseia na intensidade de luminescência onde os tons dos pixels da imagem variam de 0 a 255, sendo que o tom 0 representa o escuro absoluto (menor luminescência), enquanto que o tom 255, representa o branco absoluto (maior luminescência) (OBERHOLZER et al., 1996; LEE et al., 2001).

2.5 Índice apoptótico (IA)

Foi utilizado o método TUNEL como indicador de apoptose. Os cortes foram inicialmente desparafinados e hidratados e, logo em seguida, incubados em PBS por 5 minutos à temperatura ambiente. Após, a Proteinase K foi aplicada sobre as lâminas por 15 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas em peróxido de hidrogênio por 5 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em PBS e incubados em tampão equilíbrio por 60 minutos a 4°C. Depois, os cortes foram incubados em TdT a 37° por 1 hora em câmara úmida. Foi aplicada a solução stop por 10 minutos em temperatura ambiente, em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas em anti-digoxigenina. As lâminas foram enxaguadas em PBS e os cortes revelados com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, DakoCytomationTM) (± 20 minutos), sendo contracolorados com hematoxilina por 20 a 30 segundos. Após isso, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e colocadas em xilol para serem montadas

e observadas em microscópio de luz. O índice apoptótico foi determinado pela contagem da porcentagem de células positivas a partir de, pelo menos 500 núcleos subdivididos em 10 campos escolhidos aleatoriamente utilizando-se a objetiva de 40X (WU et al., 2013).

2.6 Análise estatística

Os dados da quantificação do índice apoptótico, do IL6, TNF α e VEGF foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, e as médias foram comparadas pelo teste de Dunn ($P < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Níveis glicêmicos

Antes da indução do diabetes os animais de todos os grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas nos níveis de glicose sanguínea, mostrando valores abaixo de 120 mg/dL. Após a indução, todos os animais, com exceção os do grupo controle (GC), apresentaram níveis sanguíneos de glicose acima de 300 mg/dL, diferindo significativamente deste grupo, confirmando assim o quadro de diabetes. Após 10 e 20 dias de administração com melatonina ou insulina evidenciou-se que o único grupo que apresentou níveis semelhantes ao grupo controle foi o administrado com insulina (GDI). No entanto, o grupo GDMS apresentou valores hiperglicêmicos menores, indicando diferença estatística em relação a glicemia dos animais diabéticos administrados com placebo (Tabela. 1).

3307

3308 *3.2 Níveis plasmáticos de insulina*

3309

3310 A dosagem dos níveis plasmáticos do hormônio insulina revelou que antes da indução
3311 ao diabetes pela estreptozotocina, todos os ratos apresentaram valores sem diferença
3312 estatística em relação ao grupo controle (Fig 15A). Entretanto, ao serem analisados após 10 e
3313 20 dias das respectivas administrações de melatonina ou insulina, observou-se que apesar de
3314 um aumento significativo nos valores da insulina plasmática do grupo administrado com
3315 melatonina a partir do 1º dia de indução ao diabetes (GDMS), apenas o grupo diabético
3316 tratado com insulina apresentou valores similares aos dos animais do grupo controle,
3317 restaurando assim, seus níveis hormonais. (Figs. 15B e 15C).

3318

3319 *3.3 Imunohistoquímica (IL6, TNF- α , VEGF-A e Índice apoptótico)*

3320

3321 A imunohistoquímica para o IL-6 na retina revelou nos animais dos grupos GC, GDM e
3322 GDMS fraca marcação, enquanto que no grupo GD evidenciou-se forte marcação nas
3323 camadas ganglionares, nuclear interna e nuclear externa, enquanto que em GDI a marcação
3324 foi moderada, restringindo-se apenas na camada nuclear externa. Com relação à quantificação
3325 em pixels da expressão do fator IL6, notou-se redução significativa dos pixels entre os grupos
3326 GD e GDI em relação aos demais grupos experimentais (Fig. 16).

3327 Na imunomarcação da retina pelo TNF α verificou-se que nos animais dos grupos GC,
3328 GDM e GDMS apresentaram fraca marcação, enquanto que nos grupos GD e GDI foi
3329 observada moderada marcação apenas na camada nuclear externa. A quantificação em pixels

da expressão do fator TNF α revelou redução significativa dos pixels nos grupos GD e GDI em relação aos demais grupos experimentais, sem, no entanto diferirem entre si (Fig. 17).

Com relação ao VEGF-A na retina, observou-se nos grupos GC, GDM e GDMS fraca marcação, e nos grupos GD e GDI moderada marcação nas camadas nuclear interna e externa. A quantificação em pixels da expressão do fator VEGF-A revelou redução significativa dos pixels entre os grupos GD e GDI, e também em relação aos outros grupos experimentais (Fig. 18).

A análise estatística revelou que apenas os tratamentos com melatonina (GDM e GDMS) apresentaram índice apoptotico com valores similares aos do grupo controle (CG). Não houve diferenças significativas entre os grupos diabético (GD) e tratado com insulina (GDI), os quais apresentaram os maiores índices. Entretanto, este último grupo não apresentou diferença significativa em relação ao grupo GDM, diferindo apenas dos grupos GC e GDMS (Fig. 19).

4. Discussão

O VEGF é um fator angiogênico citoprotetor, que pode ser ativado mediante vários insultos, como por exemplo, a hiperglicemia, tendo o estresse oxidativo como fator chave para sua produção (ÖZDEMİR et al., 2014). Esse fator se distribui normalmente através da retina, sendo mais expresso na camada de fibras nervosas, principalmente nas proximidades do disco óptico, e em torno de grandes vasos (RAJALA et al., 2000). Além disso, o esse fator tem sido relacionado a modificações observadas na RD, incluindo o edema de retina, dilatação vascular, isquemia, hemorragias e formação de microaneurismas (ÖZDEMİR et al., 2014), sendo essencial na formação e sobrevivência dos vasos sanguíneos por inibir a

apoptose das células endoteliais (CHERNIKH et al., 2014). Contudo, por ser induzido por hipóxia, o VEGF torna-se um importante mediador de neovascularização intraocular patológica (VALIATTI et al., 2011), assim, tem sido relatado que níveis elevados de VEGF pode ser um acontecimento desencadeador da retinopatia diabética (ÖZDEMIR et al., 2014).

Apesar da relação do VEGF com a RD, esse fator de crescimento é verificado bem antes do início do processo angiogênico decorrido na retinopatia (BENTO; DUARTE 2011). Além disso, é fator marcante a presença de receptores para VEGF na retina normal, sugerindo um papel importante desse fator de crescimento na função ocular normal (LAAKSO 1999). Ademais, as células endoteliais da retina possuem vários receptores para VEGF (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1998).

Bento; Duarte (2011) relataram que em modelos experimentais de diabetes, a expressão do gene para VEGF, mostrou-se aumentada nas camadas ganglionar e nuclear interna da retina e que o conteúdo de VEGF no fluido vítreo/ocular é bem mais elevado em indivíduos com RD proliferativa do que em indivíduos com RD simples (RAJALA et al., 2000).

Nossos resultados mostraram uma marcação moderada deste fator na camada nuclear interna e externa no grupo diabético e no grupo insulina. No entanto fraca, nos grupos tratados com melatonina. Hu (1997) mostrou que a melatonina reduziu a regulação positiva do VEGF no melanoma ocular em humanos, causado pela ativação da via de sinalização da proteína kinase (PKC), a qual é uma das vias que conduz a patogênese da RD (UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP 1998). Além disso, receptores de melatonina estão presentes em várias células oculares, como por exemplo, no epitélio pigmentar da retina, nos fotorreceptores, células horizontais, amácrinas e ganglionares (TOSINI et al., 2012). A ativação de receptores de melatonina pode ativar ou inibir várias vias de sinalização como a

3377 (PKC), guanilato ciclase, etc, dependendo da espécie, órgão e tecido (CAVALCANTI et al.,
3378 2006).

3379 Assim, a melatonina, regulou a expressão do VEGF direta e indiretamente, por
3380 aumentar a expressão de várias enzimas antioxidantes ou por aumentar sua atividade através
3381 da ativação de seus receptores. Ademais, Alvarez-García et al. (2013) relataram que a
3382 melatonina tem influência sobre a produção do VEGF, reduzindo a angiogênese e atuando
3383 sobre a COX-2 modulando a inflamação e inibindo a proliferação celular (WANG et al.,
3384 2012).

3385 A literatura relata que pacientes com RD apresentam ativação de reações inflamatórias,
3386 violação do estado funcional do sistema imune e desequilíbrio nos processos intercelulares
3387 indutores de citocinas (SYMEONIDIS et al., 2011).

3388 A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que tem um papel essencial nos mecanismos de
3389 cronificação dos processos inflamatórios (NEURATH; FINOTTO 2011). Nossos resultados
3390 mostraram uma forte marcação para esta citocina nas retinas grupo diabético, o que corrobora
3391 com os achados de Chernykh et al. (2014) em que pacientes com RD apresentaram alta
3392 concentração dela no vítreo, 1,9 vezes maior que no grupo sem retinopatia.

3393 No entanto, a literatura relata que inibidores da COX-2 como a melatonina, tem um
3394 papel no balanço da produção de citocinas inflamatórias, modulando diretamente sua
3395 expressão (TEGEDER; TFEILSCHIFTER; GEISLINGER, 2001; WANG et al., 2012).
3396 Esses dados corroboram com os nossos resultados em que os grupos tratados com melatonina,
3397 apresentaram fraca marcação para IL-6 se equiparando ao grupo controle, no entanto, o grupo
3398 diabético e o grupo tratado com insulina apresentaram moderada marcação.

A análise imunohistoquímica para TNF- α apresentou marcação moderada no grupo diabético e no grupo tratado com insulina. O TNF- α é um mediador inflamatório de morte neuronal após injúria isquêmica no cérebro e retina (TEZEL; WAX 2000). O papel do TNF- α em uveítes foi estabelecido e sua neutralização provou ser eficaz na preservação da acuidade visual e na diminuição da apoptose e lesão inflamatória (MURPHY et al., 2004). Estudos também têm mostrado regulação positiva de receptores para esta citocina em retinas humanas com glaucoma (TEZEL et al., 2001). Além disso, Tezel; Wax (2000) relataram que a isquemia dos vasos da retina, induziu à produção positiva de TNF- α e morte celular por apoptose em cultura de células ganglionares da retina. Berger et al. (2008) trabalhando com neutralização in vivo do TNF- α , durante significativa isquemia da retina, observou que foi preservada a função da mesma, dados evidenciados pelos resultados do eletrorretinograma.

No entanto, foi observado que a melatonina também conduziu a uma redução desse fator nos grupos tratados com esse hormônio, ocasionando uma diminuição na destruição tecidual que ocorre durante o processo inflamatório. Dessa forma, ela pode ser considerada uma opção no tratamento nas condições que cursam com a inflamação (CAUMO et al., 2007).

É amplamente conhecido que a apoptose nas células da retina é um fenômeno estabelecido na retinopatia diabética (KOWLURU; CHAN 2007). O que pode ser confirmado nesta pesquisa, em que o grupo diabético e o grupo insulina apresentaram os maiores índices apoptóticos.

Exposição dos pericitos e células endoteliais a altas doses de glicose como em animais com diabetes ocasiona um aumento no estresse oxidativo, na atividade das caspases-3 e em outros fatores de transcrição, os quais levam a morte de células capilares (KOWLURU; ABDAS; ODENBACH 2004).

Feit-Leichman et al. (2005) observaram marcação positiva nas células da microvasculatura retiniana de ratos e camundongos com 6 a 8 meses de diabetes. O mecanismo pelo qual o estresse oxidativo pode aumentar a apoptose parece complexo, mas poderia envolver o aumento na peroxidação lipídica em membranas e lesões oxidativas em macromoléculas essenciais para a função celular e alterações nos sinais de transdução e expressão de genes (MATSURA et al., 1999).

Pesquisas sugerem que o receptor de insulina é responsável por funções tróficas no cérebro (PLUM; SCHUBERT; BRUNING 2005), Estudos demonstram que a insulina estimula receptores específicos na retina (REITER et al., 2006) e que estes receptores estão diminuídos em ratos diabéticos, e a sua deleção ocasiona degeneração dos neurônios da retina e fotorreceptores (YI et al., 2005). Desta forma, o decréscimo do estímulo anabólico pela insulina pode influenciar para a morte das células da retina (ANTONETTI et al., 2006). Assim, pode-se afirmar que a longo prazo, os distúrbios na ação da insulina no tecido retiniano pode acelerar a morte celular e prejudicar atividades anabólicas que dependem de insulina como a síntese proteica (CHIHARA 1981).

Alguns autores mostraram ação anti-apoptótica da melatonina em diferentes órgãos, como timo, rim, cérebro e fígado e, atribuem isso principalmente a suas propriedades antioxidantes (KOH 2008; JOUBERT; MARAIS; MARITZ 2009), ao eliminar radicais hidroxila, peroxila, superóxidos e a oxidação da cardiolipina nas mitocôndrias (PARADIES et al., 2010). A glutathione peroxidase, uma enzima de grande importância na eliminação de radicais livres no organismo, também sofre aumento de sua produção em cérebro de ratos tratados com melatonina (WEISHAU et al., 2006). Além disso, Wang (2009) relatou que a melatonina atuaria na prevenção de doenças neurodegenerativas pela inibição da via intrínseca da apoptose e pela ativação de vias de sobrevivência.

No tecido nervoso e renal, a melatonina ocasiona queda nos níveis de expressão das proteínas pró-apoptóticas como a Fas, Fas-L e p-53 assim como aumenta a expressão de proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2 (BOATRIGT; SALVESEN 2003).

Assim, concluiu-se neste estudo que a suplementação com melatonina repercutiu positivamente sobre a regulação da expressão de citocinas inflamatórias e sobre a diminuição do índice apoptótico na retina de ratos com retinopatia diabética. Assim, a melatonina atuou como um mediador inflamatório, protegendo a retina, sendo um possível recurso terapêutico nesta enfermidade, graças às suas atividades anti-inflamatória e anti-oxidantes.

5. Referências

Aiello, L. P. Angiogenic pathways in diabetic retinopathy. Engl. J. Med, v.353, n.8, p. 839-841, 2005.

Alvarez-García, V.; González, A.; Alonso-González, C.; Martínezcampa, C.; Cos, S. Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. J. Pineal. Res, v. 54, n. 4, p. 373-380, 2013.

American Diabetes Association. Consensus development conference on the diagnosis of coronary heart disease in people with diabetes. American Diabetes Association, Diabetes Care, v. 21, p. 1551-1559, 1998.

Antonetti, D. A.; Barber, A. J.; Bronson, S. K.; Freeman, W. M.; Gardner, T. W.; Jefferson, L. S.; Kester, M.; Kimball, S. R.; Krady, J. K.; Lanoue, K. F.; Norbury, C. C.; Quinn, P. G.; Sandirasegarane, L.; Simpson, I. A.; JDRF DIABETIC RETINOPATHY CENTER GROUP.

3468 Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes*, v. 55,
3469 n. 9, p. 2401-11, 2006.

3470 Berger, S.; Savitz, S. I.; Nijhawan, S.; Singh, M.; David, J.; Rosenbaum, P. S.; Rosenbaum,
3471 D. M. Deleterious Role of TNF- α in Retinal Ischemia–Reperfusion Injury. *Invest.*
3472 *Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 49, n. 8, 2008.

3473 Bento, M. j.; Duarte, D. A. Achados moleculares da Retinopatia Diabética. *REAS*, v. 3, p.
3474 157-176, 2011.

3475 Boatright, K. M.; Salvesen, G. S. Mechanisms of caspase activation. *Cur. Opin. Cell. Biol.*, v.
3476 15, p. 725-731, 2003.

3477 Brown, D. M.; Kaiser, P. K.; Michels, M.; Soubrane, G.; Heier, J. S.; Kim, R. Y.; Sy, J. P.;
3478 Schneider, S. “Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular
3479 degeneration,” *Engl. J. Med.*, v. 355, n.14, p.1432–1444, 2006.

3480 Campochiaro, P. A. Ocular neovascularization. *J. Mol. Med.*, v.18, n. 18, 2013.

3481 Caumo, W.; Torres, F.; Moreira, N. L. Jr.; Auzani, J. A.; Monteiro, C. A.; Londero, G.;
3482 Ribeiro, D. F.; Hidalgo, M. P. The clinical impacto of preoperative melatonin on
3483 postoperative outcomes in patients undergoing abdominal hysterectomy. *Anesthe. Anal.*, v.
3484 105, n. 5, p. 1263-1271, 2007.

3485 Cavalcanti, D. M.; Lotufo, C. M.; Borelli, P.; Tavassi, A. M.; Pereire, A. L.; Markus, L. P.;
3486 Farsky, S. H. Adrenal deficiency alters mechanisms of neutrophil mobilization. *Mol. Cell.*
3487 *Endocrinol.*, v. 249, p. 32-39, 2006.

3488 Chernykh, V.; Smirnov, E.; Varvarinsky, Y.; Chernykh, D.; Obukhova, O.; Trunov, A. IL-4,
3489 IL-6, IL-10, IL-17 A and vascular endothelial growth factor in the vitreous of patients with
3490 proliferative diabetic retinopathy. *Adv. Biosci. Biotechnol.*, v. 5, p. 184-187, 2014.

3491 Chihara, E. Impairment of protein synthesis in the retinal tissue in diabetic rabbits: secondary
 3492 reduction of fast axonal transport. *J. Neurochem*, v. 37, n. 1, p. 247-50, 1981.

3493 Citirik, M.; Kabatas, E. U.; Batman, C.; Akin, K. O.; Kabatas, N. Vitreous vascular
 3494 endothelial growth factor concentrations in proliferative diabetic retinopathy versus
 3495 proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic. Res*, v. 47, p. 7-12, 2012.

3496 Dall'ago, P.; Silva, V. O. K.; DE Angelis, K. L. D.; Irigoyen, M. C.; Fazan, J. R.; Salgado, H.
 3497 C. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats.
 3498 *Braz. J. Med. Biol. Res*, v. 35, p. 843-849, 2002.

3499 Derlacz, R. A.; Poplawski, P.; Napierala, M.; Jagielski, A. K.; Bryla, J. Melatonin-induced
 3500 modulation of glucose metabolism in primary cultures of rabbit kidney-cortex tubules. *J.*
 3501 *Pineal. Res*, v. 38, p. 164-169, 2005.

3502

3503 Dubocovich, M. L.; Markowska, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in
 3504 mammals. *Endocrine*, v. 27, n. 2, p. 101-110, 2005.

3505 Dzerzhynsky, M. E.; Gorelikova, O. I.; Pustovalov, A. S. The interaction of the thyroid
 3506 gland, pineal gland and immune system in chicken. *Reprod. Biol*, v. 6, p. 79-85, 2006.

3507 Feit-Leichman, R. A.; Kinouchi, R.; Takeda, M.; Fan, Z.; Mohr, S.; Kern, T. S.; Chen, D. F.
 3508 Vascular damage in a mouse model of diabetic retinopathy: relation to neuronal and glial
 3509 changes, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, v.46, n.11, p. 4281-4287, 2005.

3510 Gariano, R. F.; Gardner, T. W. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature*, v.
 3511 438, n. 7070, p. 960-966, 2005.

3512 Gologorsky, D.; Thanos, A.; Vavvas, D. Therapeutic Interventions against Inflammatory and
 3513 Angiogenic Mediators in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Med. Inflam*, v. 2012, p.10,
 3514 2012.

3515

3516 Guven, A.; Yavuz, O.; Cam, M.; Ercan, F.; Bukan, N.; Comunoglu, C.; Gokce, F. Effect of
 3517 melatonin on streptozotocin induced diabetic liver injury in rats. *Acta Histochem*, v. 108, n.
 3518 2, p. 85-93, 2006.
 3519

3520 Hardeland, R.; Pandi-Perumal, S. R.; Cardinali, D. P.; Melatonin. *Int. J. of Biochem. Cell.*
 3521 *Biol*, v. 38, n. 3, p. 313-316, 2006.

3522 Hernández, C.; Simó, R. Neuroprotection in diabetic retinopathy. *Curr. Diab. Rep*, v.12, n.4,
 3523 p. 329-337, 2012.

3524 Hu, D. N.; Roberts. J. E. Melatonin inhibits growth of cultured human uveal melanoma cells.
 3525 *Melanoma. Res*, v. 7, p. 27-31, 1997.

3526 Joubert, A.; Marais, S.; Maritz, C. Influence of 2-methoxyestradiol on MCF-7 cells: an
 3527 improved differential interference contrasting technique and Bcl-2 and Bax protein expression
 3528 levels. *Biocell*, v. 33, p. 67-70, 2009.

3529 Kerrigan, L. A.; Zack, D. J.; Quigley, H. A.; Smith, S. D.; Pease, M. E. TUNEL-positive
 3530 ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol*, v. 115, n. 8,
 3531 p.1031-1035, 1997.

3532 Koh, P. O. Melatonin regulates nitric oxide synthase expression in ischemic brain injury. *J.*
 3533 *Res. Med. Sci*, v. 70, p.747-50, 2008.

3534 Kowluru, R. A.; Odenbach, S. Role of interleukin-1beta in the development of retinopathy in
 3535 rats: effect of antioxidants. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, v. 45, n. 11, p. 4161-4166, 2004.

3536 Kowluru, R. A.; Chan, P. S. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp. Diab. Res*, v.
 3537 2007, p.1-12, 2007.

3538 Kowluru, R. A.; Abbas, S. N.; Odenbach, S. "Reversal of hyperglycemia and diabetic
 3539 nephropathy: effect of reinstitution of good metabolic control on oxidative stress in the kidney
 3540 of diabetic rats," *J. Diab. Complic*, v.18, n. 5, p. 282–288, 2004.

3541 Laakso, M. Benefits of strict glucose and blood pressure control in type 2 diabetes: lessons
3542 from the UK Prospective Diabetes Study. *Circulation*, v. 99, p. 461-462, 1999.

3543 Lee, E. S.; Kim, J. H.; Im, S.; Lee, K. B.; Sohn, S.; Kang, W. H. Application of computerized
3544 image analysis in pigmentary skin diseases. *Int. J. Dermatol*, v. 40, p. 45-9, 2001.

3545 Lord, T.; Nixon, B.; Jones, K. T.; Aitken, R. J. Melatonin prevents post-ovulatory oocyte a
3546 ging in the mouse and extends the window for optimal fertilization in vitro. *Biol. Reprod*, v.
3547 30, p. 67-88, 2013.

3548 Maestroni, G. J. The photoperiod transducer melatonin and the immune hematopoietic
3549 system. *J. Photoch. Photobio B*, v. 43, n. 3 p. 186-192, 1998.

3550 Matura, T.; Kai, M.; Fujii, Y.; Ito, H.; Yamada, K. "Hydrogen peroxide-induced apoptosis in
3551 HL-60 cells requires caspase-3 activation," *Free Radical. Res*, v. 30, n. 1, p. 73–83, 1999.

3552 Markus, R. P.; Ferreira, Z. S.; Fernandes, P. A.; Cecon, E. The immune-pineal axis: a shuttle
3553 between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*, v. 14, n. 3-4,
3554 p. 126-133, 2007.

3555 Matura, T.; Kai, M.; Fujii, Y.; Ito, H.; Yamada, K. "Hydrogen peroxide-induced apoptosis in
3556 HL-60 cells requirescaspase-3 activation," *Free. Radical. Res*, v. 30, n. 1, p. 73–83, 1999.

3557 Mizutani, M.; Kern, T. S.; Lorenzi, M. Accelerated death of retinal microvascular cells in
3558 human and experimental diabetic retinopathy. *J. Clin. Invest*, v. 97 ,n. 12, p. 2883-2890,
3559 1996.

3560 Motta, M. M. S.; Coblentz, J. Melo, L. G. N. Aspectos atuais na fisiopatologia do edema
3561 macular diabético. *Ver. Bras. Oftalmol*, v. 67, n. 1, p. 45-9, 2008.

3562 Murphy, C. C.; Greiner, K.; Plskova, J.; Ducan, L.; Frost, A.; Isaacs, J. D.; Rebello, P.;
 3563 Waldmann, H.; Hale, G.; Forrester, J. V.; Dick, A. D. Neutralizing tumor necrosis factor
 3564 activity leads to remission in patients with refractory noninfectious posterior uveitis. *Arch.*
 3565 *Ophthalmol*, v. 122, p. 845–851, 2004.

3566 Nelson, R. J.; Demas, G. E. Seasonal changes in immune function. *Quart. Rev. Biol*, v. 71,
 3567 n. 4, p. 511-548, 1996.

3568 Neurath, M. F.; Finotto, S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and
 3569 inflammation- associated cancer. *Cyto. Growth. Fac. Rev*, v. 22, p. 83-89, 2011.

3570 Nishida, S. Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus.
 3571 *Endocrine*, v. 27, p. 131–136, 2005.
 3572

3573 Noma, H.; Funatsu, H.; Yamashita, H.; Kitano, S.; Mishima, H. K.; Hori, S. Regulation of
 3574 angiogenesis in diabetic retinopathy: possible balance between vascular endothelial growth
 3575 factor and endostatin. *Arch. Ophthalmol*, v. 120, n. 8, p. 1075-80, 2002.

3576 Oberholzer, M.; Ostreicher, M.; Christen, H.; Bruhlmann, M. Methods in quantitative image
 3577 analysis. *Histochem. Cell. Biol*, v. 105, p. 333-355, 1996.

3578 Özdemir, G.; Ergun, Y.; Bakaris, S.; Kilinc, M.; Durdu, H.; Ganiyusufoglu, E. Melatonin
 3579 prevents retinal oxidative stress and vascular changes in diabetic rats. *Eye*, v. 28, p. 1020–
 3580 1027, 2014.

3581 Ozguner, F.; Bardak, Y.; Comlekci, S. Protective effects of melatonin and caffeic acid
 3582 phenethyl ester against retinal oxidative stress in long-term use of mobile phone: A
 3583 comparative study. *Mol. Cell. Biochem*, v. 282, p. 83–88, 2006.

3584 Paradies, G.; Petrosillo, G.; Paradies, V.; Reiter, R. J.; Ruggiero, F. M. Melatonin, cardiolipin
 3585 and mitochondrial bioenergetics in health and disease. *J. Pineal. Res*, v. 48, p. 297-310, 2010.

- 3586 Pinheiro, L. S.; Melo, A. D.; Andreazzi, A. E. Protocol of Insulin Therapy For Streptozotocin-
3587 Diabetic Rats Based on a Study of Food Ingestion and Glycemic Variation. *Scand. J. Lab.*
3588 *Anim. Sci*, v. 38, n. 2, p. 145-152, 2011.
- 3589 Plum, L.; Schubert, M.; Bruning, J. C. The role of insulin receptor signaling in the brain.
3590 *Trends. Endocrinol. Metab*, v. 16, n. 2, p. 59-65, 2005.
- 3591 Rajala, U.; Panjunpää, H.; Koskela, P.; Keinänen-Kuikaanniemi, S. High cardiovascular
3592 disease mortality in subjects with visual impairment caused by diabetic retinopathy. *Diabetes*
3593 *Care*, v. 23, p. 957-61, 2000.
- 3594 Rangasamy, S.; Mcguire, P. G.; Das, A. "Diabetic retinopathy and inflammation: novel
3595 therapeutic targets," *Middle East African. J. Ophthalmol*, v. 19, n.1, p. 52–59, 2012.
- 3596 Reiter, R. J.; Tan, D. X.; Osuna, C.; Gitto, E. Actions of melatonin in the reduction of
3597 oxidative stress: a review. *J. Biomed. Res*, v. 7, p. 444–458, 2000.
3598
- 3599 Reiter, C. E.; Wu, X.; Sandirasegarane, L.; Nakamura, M.; Gilbert, K. A.; Singh, R. S.; Fort,
3600 P. E.; Antonetti, D. A.; Gardner, T. W. Diabetes reduces basal retinal insulin receptor
3601 signaling: reversal with systemic and local insulin. *Diabetes*, v. 55, n. 4, p. 1148-56, 2006.
- 3602 Rodriguez, C.; Mayo, J. C.; Sainz, R. M.; Antolín, I.; Herrera, F.; Martín, V.; Reiter, R. J.
3603 Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal. Res*, v. 36, p. 1–
3604 9, 2004.
- 3605 Salustiano, E. M. A. Perfil sérico de melatonina, citocinas e cortisol em gestantes com pré-
3606 eclâmpsia. Tese apresentada a faculdade de medicina, 2014.
- 3607 Serrarbassa, P. D.; Dias, A. F. G.; Vieira, M. F. Novos conceitos em retinopatia diabética:
3608 dano neurológico versus dano vascular *Arq. Bras. de Oftalmol*, v. 71, n. 3, p. 459-63, 2008.

3609 Srinivasan, V.; Spence, D. W.; Trakht, I.; Pandi-Perumal, S. R.; Cardinali, D. P.; Maestroni,
 3610 G. J. Immunomodulation by melatonin: its significance for seasonally occurring diseases.
 3611 Neuroimmunomodulation, v.15, n. 2, p. 93-101, 2008.

3612 Sudnikovich, E. J.; Maksirachik, Y. Z.; zabrodsкая, S. V.; Kubyshin, V. L.; Lapshina, E. A.;
 3613 Bryszewska, M.; Reiter, R. J.; Zavodnik, I. B. Melatonin attenuates metabolic disorders due
 3614 to streptozotocin-induced diabetes in rats. Euro. J. Pharmacol., v. 569, n. 3, p.180–187, 2007.

3615 Symeonidis, C.; Papakonstantinou, E.; Androudi, S.; Rotsos, T.; Diza, E.; Brazitikos, P.;
 3616 Karakiulakis, G.; Dimitrakos, S. A. Interleukin-6 and the matrix metalloproteinase response
 3617 in the vitreous during proliferative vitreoretinopathy. Cytokine, v. 54, p. 212-217, 2011.

3618 Tang, J.; Kern, T. S. Inflammation in diabetic retinopathy. Prog. Ret. Eye. Res, v. 30, n. 5, p.
 3619 343-58, 2011.

3620 Tegeder, I.; Tfeilschifter, J.; Geisslinger, G. Cyclooxygenase-independent actions of
 3621 cyclooxygenase inhibitors. FASEB. J, v. 15, p. 2057-2072, 2001.

3622 Tezel, G.; Wax, M. B. Increased production of tumor necrosis factor- α by glial cells
 3623 exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in
 3624 cocultured retinal ganglion cells. J. Neurosci, v. 20, p. 8693–8700, 2000.

3625 Tezel, G.; Ly, L. I.; Patil, R. V.; Wax, M. B. TNF- α and TNF- α receptor-1 in the
 3626 retina of normal and glaucomatous eyes. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, v. 42, p. 1787–1794,
 3627 2001.

3628 Tosini, G.; Baba, K.; Hwang, C. K.; Iuvone, P. M. Melatonin an underappreciated player in
 3629 retinal physiology and pathophysiology. Exp. Eye. Res, v. 103, p. 82–89, 2012.

3630 UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP. (UKPDS). Tight blood pressure control
 3631 and risk of macrovascular disease and microvascular complications in type 2 diabetes:
 3632 UKPDS 38. *BMJ*, v. 317, p. 703-713, 1998.

3633 Valiatti, F. B.; Crispim, D.; Benfica, C.; Valiatti, B. B.; Kramer, C. K.; Canani, L. H. Papel
 3634 do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética. *Arq.*
 3635 *Bras. Endocrinol. Metabol*, v. 55, n. 2, 2011.

3636 Yi, X.; Schubert, M.; Peachey, N. S.; Suzuma, K.; Burks, D. J.; Kushner, J. A.; Suzuma, A.;
 3637 Cahill, C.; Flint, C. L.; Dow, M. A.; Leshan, R. L.; King, G. L.; White, M. F. Insulin receptor
 3638 substrate 2 is essential for maturation and survival of photoreceptor cells. *J. Neuroscience*, v.
 3639 25, n. 5, p.1240-8, 2005.

3640 Wang, X. The antiapoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases. *CNS*
 3641 *Neurosci. Ther*, v. 15, p. 345-57, 2009.

3642 Weishaupt, J. H.; Bartels, C.; Polking, E.; Dietrich, J.; Rohde, G.; Poeggeler, B.; Mertens, N.;
 3643 Sperling, S.; Bohn, M.; Huther, G.; Schneider, A.; Bach, A.; Siren, A. L.; Hardeland, R.;
 3644 BahR, M.; Nave, K. A.; Ehrenreich, H. Reduced oxidative damage in ALS by high-dose
 3645 enteral melatonin treatment. *J. Pineal Res.* v. 41, p. 313-23, 2006.

3646 Wang, J.; Xiao, X.; Zhang, Y.; Shi, D.; Chen, W.; Fu, L.; Liu, L.; Xie, F.; Kang, T.; Huang,
 3647 W.; Deng, W. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by
 3648 melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. *J. Pineal Res*, v.
 3649 53, p. 77-90, 2012.

3650 Wu, X.; Cheng, B.; Cai, Z. D.; Lou, L. M. Determination of the apoptotic index in
 3651 osteosarcoma tissue and its relationship with patients prognosis. *Can. Cell. Inter*, v. 13, n. 56,
 3652 p.1-4, 2013.

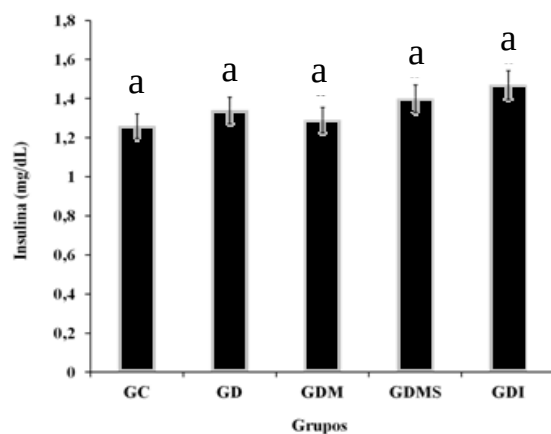
3653 **Tabela 1.** Média $\pm$ desvio-padrão dos níveis de plasmáticos de glicose (mg/dL). GC- grupo
 3654 controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético tratado com melatonina; GDMS –
 3655 grupo diabético tratado com melatonina simultâneamente; GDI – grupo diabético tratado com
 3656 insulina.

Grupos	Antes da indução do diabetes	Após indução do diabetes (7º dia)	Meio do tratamento (10ºdia)	Fim do tratamento (20ºdia)
GC	95,40 $\pm$ 3,44aA	96,01 $\pm$ 4,55bA	99,21 $\pm$ 1,09cA	102,77 $\pm$ 5,84cA
GD	94,89 $\pm$ 1,11aC	350,16 $\pm$ 7,61aB	395,19 $\pm$ 9,15aA	401,43 $\pm$ 1,98aA
GDM	97,12 $\pm$ 2,94aC	345,92 $\pm$ 5,22aB	399,70 $\pm$ 4,09aA	406,17 $\pm$ 8,12aA
GDMS	101,43 $\pm$ 3,67aC	349,33 $\pm$ 8,01aA	317,30 $\pm$ 3,99bB	314,75 $\pm$ 4,91bB
GDI	96,72 $\pm$ 2,04aB	347,83 $\pm$ 6,66aA	99,60 $\pm$ 1,88cB	91,50 $\pm$ 7,89cB
P	0,0654	0,0012	0,0155	0,0453

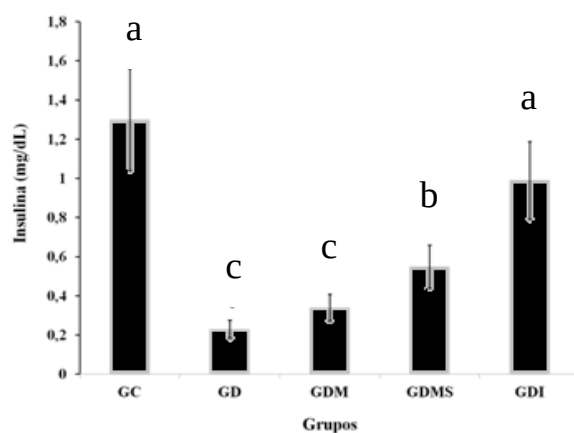
3657 Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e miúsculas nas linhas não
 3658 diferem entre si de acordo com o teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

3659

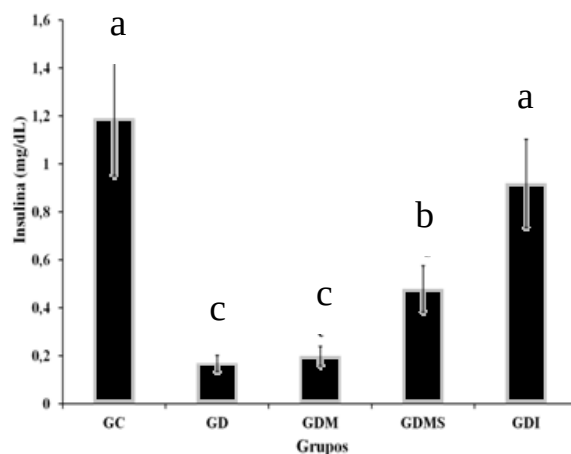
3660



A



B



C

Figura 15. Níveis plasmáticos do hormônio insulina (mg/dL). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético tratado com melatonina; GDMS – grupo diabético tratado com melatonina simultânea; GDI – grupo diabético tratado com insulina. **A-** grupos experimentais antes da indução; **B-** grupos experimentais com 10 dias das administrações; **C-** grupos experimentais com 20 dias das administrações. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

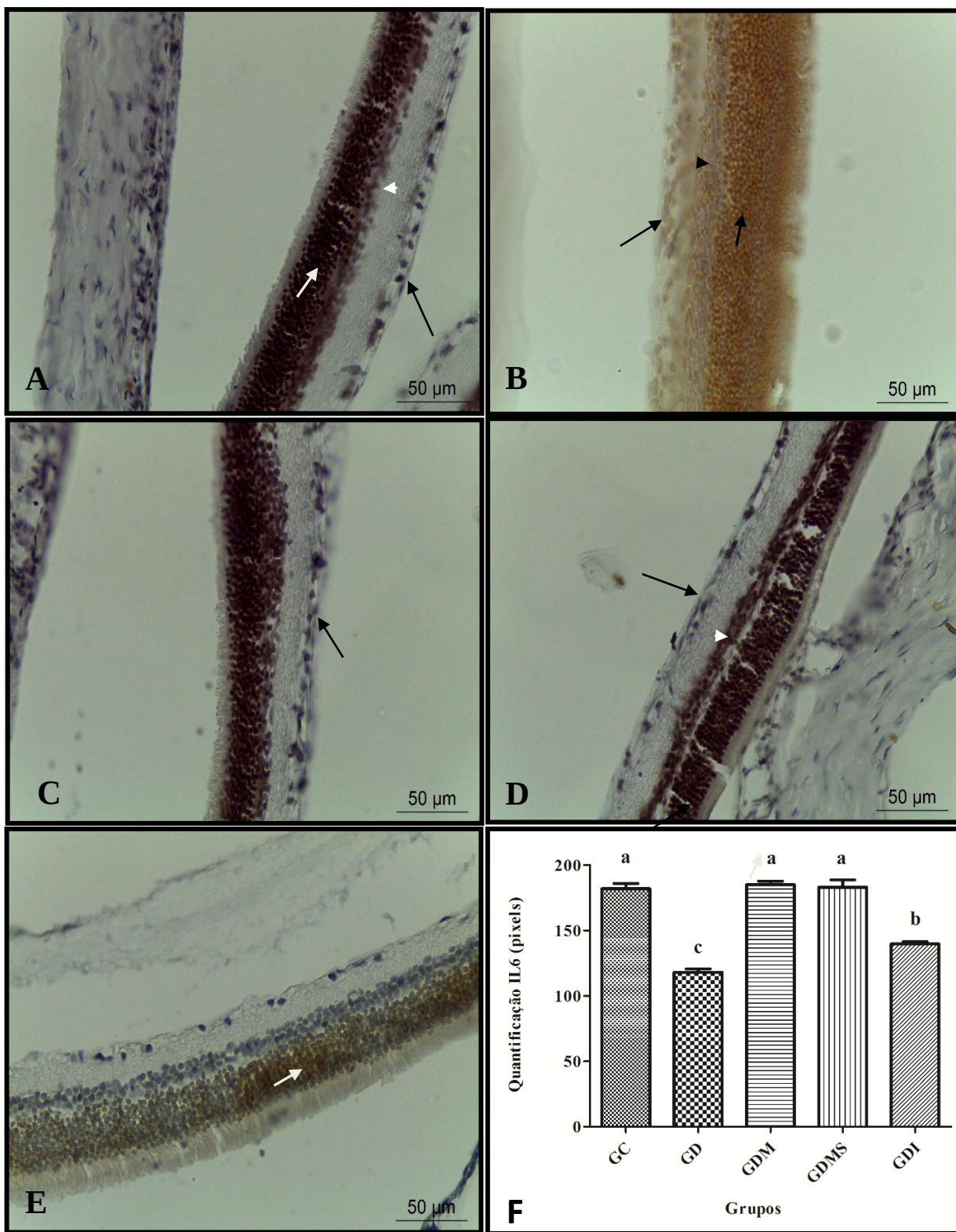


Figura 16: Imunohistoquímica e quantificação do IL6 na retina. Observar em A (GC), C (GDM) e D (GDMS) fraca marcação, em B (GD) forte marcação nas camadas ganglionares (seta longa), nuclear interna (cabeça da seta) e nuclear externa (seta curta), enquanto que em E (GDI) nota-se moderada marcação apenas na camada nuclear externa (seta branca). F – Quantificação em pixels da expressão do fator IL6. Notar redução significativa dos pixels entre os grupos GD e GDI, e em relação aos demais grupos experimentais. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

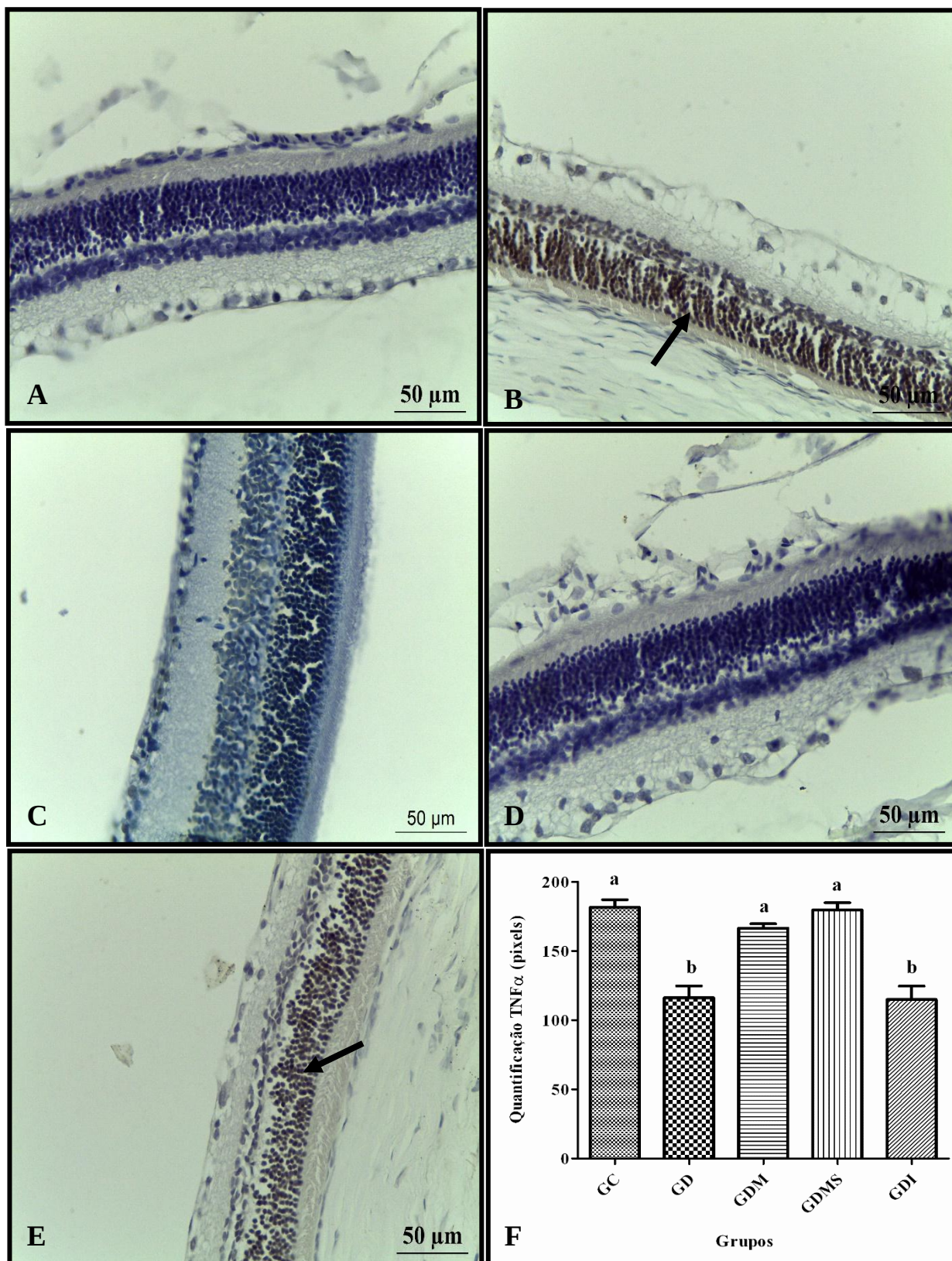


Figura 17: Imunohistoquímica e quantificação do TNF α na retina. Observar em A (GC), C (GDM) e D (GDMS) fraca marcação, em B (GD) e E (GDI) moderada marcação apenas na camada nuclear externa (seta). F – Quantificação em pixels da expressão do fator TNF α . Notar redução significativa dos pixels nos grupos GD e GDI em relação aos demais grupos experimentais. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

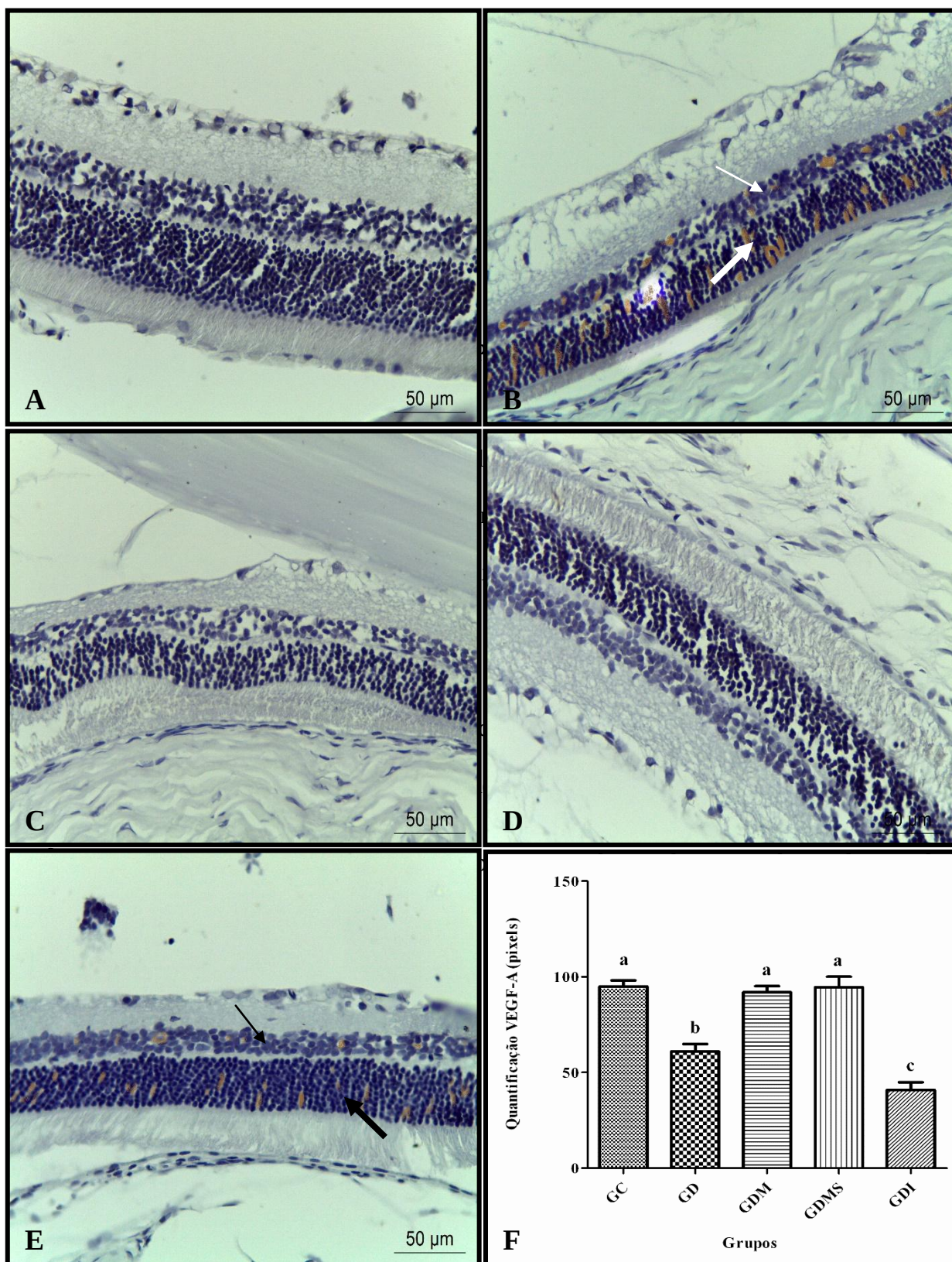


Figura 18: Imunohistoquímica e quantificação do VEGF-A na retina. Observar em A (GC), C (GDM) e D (GDMS) fraca marcação, em B (GD) e E (GDI) moderada marcação nas camadas nuclear interna (seta fina) e externa (seta grossa). F – Quantificação em pixels da expressão do fator VEGF-A. Notar redução significativa dos pixels entre os grupos GD e GDI, e em relação aos outros grupos experimentais. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

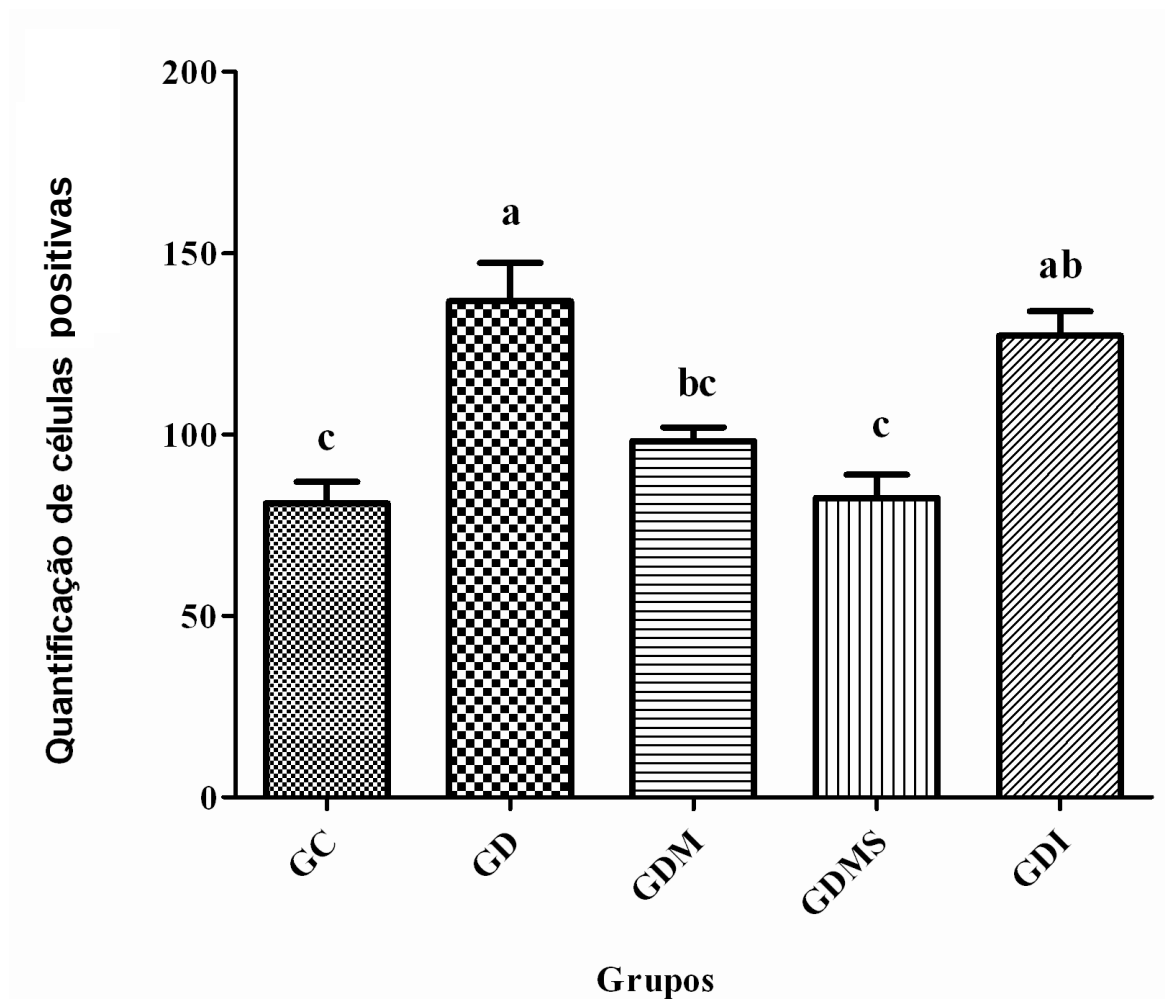


Figura19: Índice apoptótico na retina. Observar redução significativa nos grupos GDM e GDMS em relação ao grupo GD. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).