



**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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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.

## 1 RESUMO

2

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

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

34 **ABSTRACT**

35

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

64

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

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

160	<b>RNS</b>	Espécies reativas ao nitrogênio
161	<b>RGB</b>	Red-green-blue (vermelhor-verde-azul)
162	<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
163	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral
164	<b>TBARS</b>	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
165	<b>TNFR1</b>	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
166	<b>TNFR2</b>	Receptor 2 do fator de necrose tumoral
167	<b>TdT</b>	Desoxinucleotídeo terminal transferase
168	<b>U/dia</b>	Unidades por dia
169	<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
170	<b>VEGFR-1</b>	Receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular
171	<b>VEGFR-2</b>	Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular
172	<b><math>\gamma</math>-CGS</b>	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 coroide (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>B-</b> gráfico mostrando amplitude em $\mu\text{V}$ $p < 0,05$ e tempo implícito	
256	em ms $p < 0,05$ entre os grupos.....	107
257	<b>Figura 12.</b> Eletroretinograma fotópico entre os grupos experimentais. <b>A-</b> formato	
258	das ondas adquiridas pelo eletrorretinograma dos grupos. Não foi observada	
259	diferença estatística entre eles. <b>B-</b> gráfico mostrando amplitude em $\mu\text{V}$ $p < 0,05$ e	
260	tempo implícito em ms $p < 0,05$ entre os grupos.....	108
261	<b>Figura 13.</b> Eletroretinograma escotópico misto dos grupos experimentais. <b>A-</b>	
262	formato da onda adquirido no eletrorretinograma. Foi observada diferença estatística	
263	na amplitude da onda a entre o GC e o GD. <b>B-</b> gráfico mostrando amplitude em $\mu\text{V}$	
264	$p < 0,05$ e tempo implícito em ms $p < 0,05$ entre os grupos.....	109
265	<b>Figura 14.</b> Eletroretinograma flicker dos animais dos grupos experimentais. <b>A-</b>	
266	formato das ondas adquiridas pelo eletrorretinograma dos grupos. <b>B –</b> Tempo	
267	Implícito do Flicker, em ms.– Amplitude do Flicker, em $\mu\text{V}$ . * $p < 0,05$ .....	110
268	<b>Figura 15.</b> 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. <b>A-</b> grupos experimentais antes da indução; <b>B-</b> grupos experimentais com 10	
272	dias das administrações; <b>C-</b> 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	<b>Figura 16.</b> 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	<b>Figura 17.</b> 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 $\alpha$ . 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

314

315

316

## CAPÍTULO I

317

318

### 1. INTRODUÇÃO

320

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

334

335 Nesta enfermidade, a principal alteração ocular ocorre na retina, cerca de  
336 40% dos diabéticos têm algum grau de retinopatia que depende dos anos de  
337 duração e do controle inadequado da doença (MEDINA; MUÑOZ, 2011). A  
338 retinopatia diabética (RD) é caracterizada por um conjunto de alterações vasculares  
339 da retina que acomete quase todos os pacientes com diabetes mellitus e, é  
340 considerada a principal causa de cegueira em adultos na idade produtiva, (BARBER,  
2003; KOLLIAS, ULBIG, 2010; MEDINA; MUÑOZ, 2011).

341

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

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

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

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

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

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

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

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

392 O controle metabólico do diabetes mellitus é um importante fator na  
393 progressão e gravidade da retinopatia diabética, sendo que pacientes tratados de  
394 forma intensiva (objetivando glicose sanguínea e hemoglobina glicosilada o mais  
395 próximo do normal), tem reduzido o risco de complicações microvasculares havendo,  
396 portanto, grande associação entre o grau do controle metabólico e o  
397 desenvolvimento desta enfermidade (LOVESTAM-ADRIAN; AGARDH; TORFFVIT,  
398 1999; THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATION TRIAL, 2000).

399 Distintos trabalhos demonstraram que a melatonina tem um papel no gasto  
400 energético, no ritmo circadiano da glicemia, na regulação da massa corporal e sobre  
401 a secreção e ação da insulina periférica (LIMA et al., 1998; LA FLEUR et al., 2001;  
402 PICINATO et al., 2002). A relação entre a melatonina, pâncreas endócrino, e  
403 regulação do metabolismo energético têm sido sugeridas tanto em humanos quanto  
404 em ratos (LA FLEUR et al., 1999; PESCHKE et al., 2007). Este hormônio possui  
405 efeitos modulatórios positivos sobre a secreção e ação da insulina (PESCHKE et al.,  
406 2007).

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

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

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

420

## 421 2. REVISÃO DE LITERATURA

422

### 423 2.1 Diabetes mellitus

424

425 O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico crônico, caracterizado por  
426 níveis elevados na concentração de glicose circulante, em função da deficiência na  
427 secreção (Diabetes mellitus tipo 1), ou, no comprometimento da ação periférica da  
428 insulina (resistência à insulina), o que caracteriza o diabetes mellitus tipo 2 (SILVA  
429 et al., 2011). Cerca de 350 milhões de pessoas no mundo são estimadas ter  
430 diabetes (DANAËI et al., 2011) com o tipo 2 respondendo a cerca de 90% de todos  
431 os casos diagnosticados (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008),  
432 representando assim, um grande problema na saúde pública ( LUO; MEI-LING,  
433 2014).

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

442 Os Estados Unidos é um dos principais países afetados com essa doença  
443 apresentando 28 milhões de pessoas comprometidas e com uma incidência anual  
444 de 180 mil novos casos (GO et al., 2013). O risco de doenças cardiovasculares é  
445 também bastante elevado em pacientes com diabetes, representando a causa  
446 primária de sua morbidade e mortalidade (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION,  
447 2014). Especificamente, indivíduos com diabetes apresentam uma disfunção na  
448 regulação do fluxo sanguíneo nas artérias coronárias (BAGI; FEHER; BELEZNAI,  
449 2009).

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

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

457 A hiperglicemia nessa enfermidade ocorre devido ao débito hepático alterado  
458 de glicose, e, à captação diminuída de glicose pelos músculos esqueléticos com  
459 síntese reduzida de glicogênio (SILVA et al., 2011) além disso, ela ocasiona  
460 alterações no metabolismo dos lipídeos e proteínas (DAS; PADAYUTTI; PAULOSE,  
461 1996). Bem como, a insulina é o hormônio anabólico que após interação com seu  
462 receptor de membrana específico, estimula a captação de glicose pelas células por  
463 meio de proteínas integrais de membrana denominadas GLUTs (MOURA et al.,  
464 2012). Tal evento regula a homeostase glicêmica, estimula a lipogênese hepática, e  
465 nos adipócitos reduz a lipólise, bem como regula o “turnover protéico” (SABETSKY;  
466 EKBLÖM, 2010).

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

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

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

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

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

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

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

518 Descoberta em 1921, a insulina é utilizada em terapias no caso de câncer,  
519 queimaduras, injúrias severas, além do diabetes (MARTINEZ-RIQUELME; ALLISON,  
520 2003). Ela apresenta ação no fígado, músculo e tecido adiposo via ativação do  
521 receptor insulina. Utilizada em todos os caso do DM tipo 1 e, em alguns casos  
522 (30%), em indivíduos com DM tipo 2. Ela promove a síntese e armazenamento de  
523 carboidratos, lipídios proteínas, além de inibir a quebra e liberação dos mesmos para  
524 a corrente sanguínea (SALTIEL; KAHN, 2001).

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

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

537

## 538 **2.2. A retina**

539

### 540 **2.2.1. Estrutura**

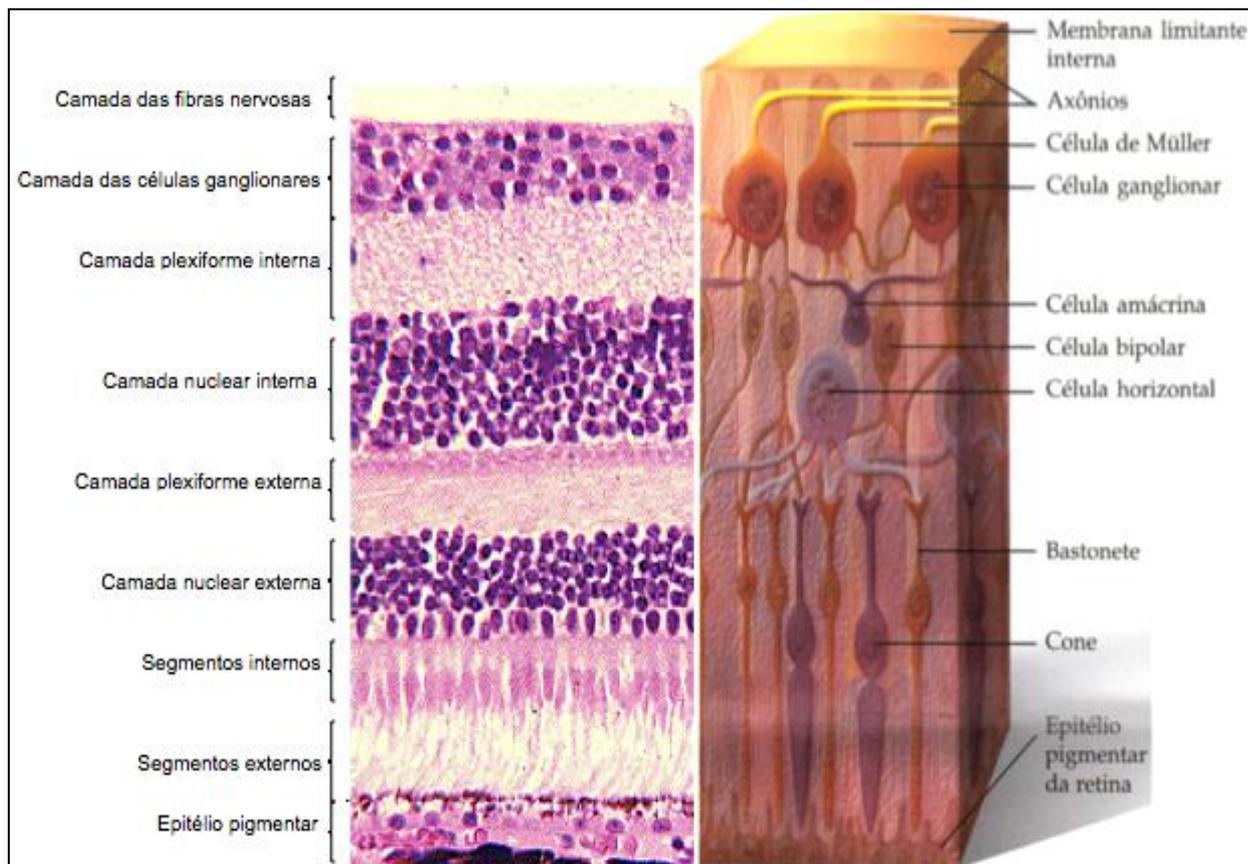
541

542 A retina é responsável pelo fenômeno chamado fototransdução, que é a  
543 transformação do estímulo luminoso em energia elétrica, ou seja, ela capta os  
544 fótons, converte a energia fotoquímica em energia elétrica, integra os potenciais de  
545 ação resultantes e transmite para o lobo occipital do cérebro, local que ocorre a  
546 decifração e interpretação das imagens (SERRARBASSA; DIAS; VIEIRA, 2008). A  
547 retina é separada da circulação sistêmica pelas barreiras hemato-retinianas e  
548 hemato-aquosa e recebe seus suprimentos nutricionais das circulações retiniana e  
549 coroidal, e possivelmente do corpo ciliar por difusão através do vítreo (BITO;  
550 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



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

573

574

575 A camada de células fotorreceptoras é formada pelos cones e bastonetes,  
 576 essas células estão próximas à superfície externa da retina, e a luz, para atingi-las,  
 577 deve atravessar toda a cavidade vítrea e a parte interna da retina (BOSCO et al.,  
 578 2005). A camada mais externa é o epitélio pigmentado, o qual está em íntimo  
 579 contato com os segmentos externos dos fotorreceptores (CORMACK, 1996).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

648

### 649 **2.2.2. Fototransdução**

650

651 O processamento de informação luminosa no sistema nervoso central se  
652 inicia quando a luz atravessa toda a retina e estimula o segmento externo dos  
653 fotorreceptores, apesar de suas diferenças estruturais e funcionais, os  
654 fotorreceptores desempenham mecanismos semelhantes de conversão da  
655 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

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

690 Assim, quando os sinais das células bipolares finalmente chegam às células  
691 ganglionares, será gerado um potencial de ação nestas células, cujos axônios irão  
692 se agrupar formando o nervo óptico e convergir para o disco óptico. O nervo óptico  
693 conduzirá este potencial para os centros superiores de processamento visual (LENT,  
694 2010).

### 695 **2.2.3. Suprimento sanguíneo da retina**

696

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

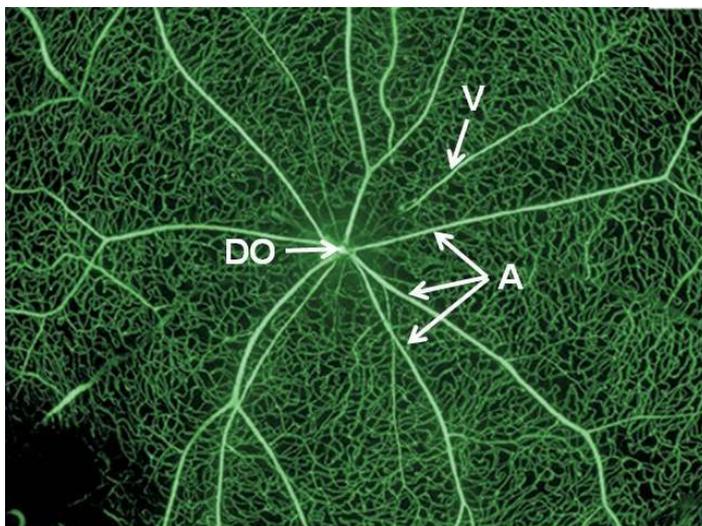
702 No sistema visual, a luz tem de atravessar toda a espessura da retina para  
703 alcançar os fotorreceptores, desta forma a distribuição espacial das estruturas  
704 vasculares deve interferir o menos possível com a passagem da luz. Na verdade, as  
705 estruturas vasculares representam menos de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

706 (GARDNER et al., 2002).

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

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

720 plexo vascular profundo que invade a camada plexiforme externa (PAQUES et al.,  
721 2003).



722

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

728

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

736

### 737 **2.3 Retinopatia diabética**

738

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

808

## 809 **2.4 Melatonina**

810

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

882

## 883 **2.5 Melatonina e diabetes**

884

885 A avaliação das relações entre diabetes, metabolismo da glicose, e os efeitos  
886 da melatonina é um tema de grande interesse (DERLACZ et al., 2005). Foi sugerido  
887 que tratamentos com antioxidantes podem ser uma importante opção terapêutica na  
888 prevenção das complicações vasculares causadas pelo diabetes (BONJUGA et al.,  
889 2004). A proteção antioxidante da melatonina já foi demonstrada tanto *in vivo* como  
890 *in vitro* ao nível de membrana celular, mitocôndrias e núcleo (REITER, 2000). Além  
891 de suas ações como um eliminador de radicais livres, ela também estimula enzimas  
892 antioxidantes, como por exemplo a superóxido dismutase a glutathione peroxidase e  
893 a glutathione reductase, o que promove ainda mais a sua capacidade de reduzir a  
894 toxicidade dos radicais livres e dos seus reagentes associados (REITER et al., 2000;  
895 RODRIGUEZ et al., 2004). Pesquisas mostraram que melatonina poderia restaurar  
896 o status antioxidante prejudicado em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina  
897 (ANWAR; MEKI, 2003). Da mesma forma, sua administração à longo prazo reduziu a  
898 hiperlipidemia e a hiperinsulinemia e restaurou a relação dos ácidos graxos  
899 poliinsaturados no soro e tecidos de ratos diabéticos (NISHIDA, 2005).

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

903

## 904 **2.6 Melatonina e retina**

905

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

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

911 Os olhos, como outras estruturas, estão sujeitas a estresse oxidativo,  
912 persistente na forma de espécies reativas ao oxigênio (ROS) ou, ao nitrogênio  
913 (RNS), mediante a oxidação de moléculas essenciais, e esses agentes contribuem  
914 para uma variedade de doenças de estruturas oculares, entre elas, a retinopatia da  
915 prematuridade, a retinite pigmentosa, a catarata, o glaucoma entre outras (SIU et al.,  
916 2006).

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

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

929 Essas ações desse hormônio ajudam a proteger as estruturas oculares do  
930 abuso dos radicais livres, eliminando esses radicais, preservando a regulação das  
931 atividades das enzimas antioxidantes e aumentando a atividade de transferência de  
932 elétrons da mitocôndria, evitando assim, a geração de radicais livres (SIU et al.,  
933 2006).

934

## 935 **2.7 Eletrorretinograma**

936

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

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

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

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

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

956

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

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

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

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

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

978 A escotópica de potencial oscilatório são quatro a dez ondas de baixa  
979 amplitude e alta frequência sobrepostas na onda *a* ou no ramo ascendente da onda  
980 *b* do eletroretinograma (SIMS, 1999). São altamente correlacionadas com uma  
981 circulação retiniana intacta, sendo então, indicadores de sensíveis isquemia  
982 retiniana (SEVERNS; JOHNSON; BRESNICK, 1994). Yonemura e colaboradores  
983 (1962) observaram que as ondas *a* e *b* apresentavam-se normais em retinopatias de  
984 grau leve, enquanto o potencial oscilatório estavam diminuídos ou ausentes.

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

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

997 A análise do PO pode ser feita pela soma das amplitudes dos quatro  
998 componentes predominantes da resposta do eletroretinograma ou somar as  
999 amplitudes de todos os picos, denominados índice oscilatório (NUSINOWITZ;  
1000 HECKENLIVELY, 2006).

1001 Um outro ponto a ser analisado no eletroretinograma é a resposta fotópica de  
1002 cones a flash isolado, nele, só é refletida a atividade dos cones, obtida através da  
1003 saturação dos bastonetes através de uma luz branca de fundo com luminância da  
1004 luz de 17 a 34 cd/m<sup>2</sup>, é feito um período de adaptação à luz de dez minutos, pois as  
1005 respostas dos cones tendem a crescer nos primeiros minutos, a intensidade do  
1006 estímulo luminoso é máxima (MARMOR et al., 2004).

1007 Por fim, têm-se a fotópica de flicker, nela, a resposta à estimulação  
1008 intermitente em uma frequência de 30 Hz (60 reversões entre claro e escuro/  
1009 segundo) é registrada na presença de luz de fundo ( $34 \text{ cd/m}^2$ ), após um período de  
1010 adaptação à luz de dez minutos isolando-se a respostas dos cones, o tamanho da  
1011 resposta é medida do pico da resposta mínima ao pico da resposta máxima. O  
1012 tempo de culminação da onda *b* é medido a partir do início do estímulo até o pico  
1013 máximo da onda *b* (MARMOR et al., 2004).

1014

## 1015 **2.8 Componentes analisados no eletrorretinograma**

1016

1017 A resposta elétrica resultante de um estímulo gerado por uma corrente  
1018 alternada de curta duração é constituída por três ondas básicas, bifásica,  
1019 apresentando a forma senoidal, com um componente negativo (onda-*a*), um positivo  
1020 (onda-*b*) e a onda-*c* (SANTIESTEBAN et al., 2005). A origem dessas ondas ocorre a  
1021 partir de tipos específicos de células que compõem a retina (MARMOR et al., 2009).

1022 A onda-*a* é formada pelas correntes iônicas extracelulares geradas pelos  
1023 fotorreceptores (cones e bastonetes), ou seja, ela resulta da hiperpolarização dos  
1024 fotorreceptores, originando uma onda com amplitude negativa, mensurada a partir  
1025 da linha de base até o pico da mesma, apresenta dois componentes, um rápido e  
1026 um lento (Figura 3). (SANTIESTEBAN et al., 2005). O componente rápido resulta da  
1027 reação do fotorpigmento à presença de luz, o segundo constitui a transmissão do  
1028 sinal gerado pelo fotorreceptor, a inclinação da onda que resulta da diminuição dos  
1029 níveis de potássio  $\text{K}^+$  dos fotorreceptores pela ação das células de Müller  
1030 (SANTIESTEBAN et al., 2005).

1031 A onda-*b* (Figura 3) representa amplitude positiva, reflete principalmente a  
1032 atividade das células bipolares da retina, que se encontram entre os fotorreceptores  
1033 e as células ganglionares, transmitindo os sinais dos fotorreceptores para as células  
1034 ganglionares (HECKENLIVELY; ARDEN, 2006).

1035 A onda-*c* (onda positiva de aparecimento bem mais tardio) está relacionada  
1036 com a polarização do epitélio pigmentar da retina (EPR) e pode ser observada  
1037 quando é feito um tipo especial de ERG, o ERG de longos flashes (GUM, 1980).

1038 Enquanto as ondas *a* e *b* aparecem na escala de milisegundos, a onda *c*  
1039 aparece na escala de segundos. O aparecimento da onda-*c* no epitélio pigmentar da

1040 retina depende do fluxo de potássio das outras camadas da retina. Só que o fluxo  
1041 extracelular de potássio depende da fototransdução. Portanto, a onda-c pode nos  
1042 dar um panorama da fototransdução como um todo, da integridade do epitélio  
1043 pigmentar da retina e da interação do EPR e do resto da retina. A pesquisa da onda-  
1044 c não é rotineira, geralmente só é pesquisada quando já se sabe que há algo errado  
1045 com o ERG de flash-padrão e, conseqüentemente, com a retina (GUM, 1980).

1046 Para interpretar clinicamente o ERG, a mensuração da amplitude da onda-*b*  
1047 em microvolts ( $\mu\text{V}$ ) é a mais utilizada, pois além de ser maior, é a onda mais fácil de  
1048 mensurar seu ápice (KOMAROMY et al., 1998). Onda-*b* com baixa amplitude  
1049 significa diminuição do número total de fotorreceptores (KOMAROMY et al., 1998).  
1050 Teoricamente, as amplitudes das ondas *a* e *c* também podem ser usadas para  
1051 interpretar função retiniana. A mensuração da amplitude da onda-*b* é feita do ponto  
1052 mais negativo da onda-*a* até o ponto mais positivo da onda-*b* e é denominada de  
1053 amplitude pico a pico (SALOMÃO, 2002).

1054 Em doenças vasculares da retina observa-se diminuição da amplitude da  
1055 onda-*a* e onda-*b* que foi primeiramente descrito por Henkes em 1953 em pacientes  
1056 que apresentavam oclusão da artéria central da retina.

1057

1058

1059

1060

1061

1062

1063

1064

1065

1066

1067

1068

1069



1070

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

1071

1072

## 1073 **2.9 Eletrorretinograma e enfermidades**

1074

1075 A eletrorretinograma é o exame utilizado para confirmação da perda das  
1076 células fotorreceptoras da retina (CULLEN; GRAHN, 2002). Na medicina, é usada  
1077 tanto pra diagnosticar como para avaliar a progressão de degenerações da retina,  
1078 intoxicações, e, no caso de pacientes diabéticos, para diagnosticar e acompanhar a  
1079 retinopatia proliferativa e não prolíerativa (MARMOR et al., 2003). Sendo importante  
1080 porque alterações no padrão do ERG podem preceder alterações de fundo de olho  
1081 em algumas doenças (BEREZOVSKY et al., 2005).

1082 O diabetes melitus tipo dois, no qual, alguns pacientes apresentaram alguns  
1083 componentes alterados no eletrorretinograma de campo total com fundo de olho  
1084 normal, diminuição da amplitude da onda *b* e dos potenciais oscilatórios e aumento  
1085 das latências (GUALTIERI, 2004). Reduções de amplitudes e aumento de latência  
1086 também foram encontradas no eletroerretinograma multifocal (GUALTIERI, 2009).

1087 Em ratos diabéticos, Sakai et al. (1995), observaram que a amplitude e o pico  
1088 de latência das ondas *a* e *b* não diferenciaram daquelas do grupo controle, no  
1089 entanto, apresentaram uma amplitude significativamente menor do potencial  
1090 oscilatório.

1091 A catarata, a qual é responsável pela principal causa de cegueira em cães em  
1092 diferentes idades, principalmente da raça poodle (ADKINS; HENDRIX, 2005). Nesta  
1093 enfermidade, ocorre a impossibilidade para a oftalmoscopia e detecção de qualquer  
1094 anormalidade no segmento posterior, fazendo com que o eletrorretinograma se torne  
1095 uma ferramenta indispensável (SAFATLE et al., 2010). Pesquisas em cães  
1096 demonstraram que quanto mais jovem, maiores são as amplitudes e quanto mais  
1097 velhos menores são as amplitudes de respostas (NARFSTRÖM et al., 2002).

1098 Na retinopatia diabética, o resultado do exame de eletrorretinograma pode ser  
1099 afetado logo no início do diabetes mellitus. Sendo, o conhecimento do início do  
1100 tratamento da retinopatia diabética e o monitoramento dos seus efeitos através  
1101 deste exame necessários para detectar as alterações subclínicas desta enfermidade  
1102 (PALMOWSKI et al., 1997).

1103 Para pacientes diabéticos com retinopatias, a magnitude do atraso de tempo  
1104 no eletrorretinograma correlaciona-se com a gravidade da retinopatia diabética e

1105 localizações anormais do mesmo está correlacionado espacialmente com  
1106 anormalidades anatômicas (GREENSTEIN et al., 2000).

1107 A capacidade de prever locais na retina de futuras retinopatias baseados em  
1108 eletrorretinogramas, oferece aos médicos uma ferramenta poderosa para tratamento  
1109 profilático precoce do tecido da retina em pacientes diabéticos, auxiliando também a  
1110 identificação de populações de riscos (BEARSE et al., 2006).

1111

## 1112 **2.10 Estresse oxidativo e diabetes**

1113

1114 O estresse oxidativo (EO) pode ser definido como um desequilíbrio  
1115 persistente entre a produção de espécies moleculares altamente reativas  
1116 (principalmente oxigênio e nitrogênio) e defensores antioxidantes (ROSEN et al.,  
1117 2001). Ele é o resultado do aumento do conteúdo de espécies reativas ao oxigênio  
1118 (ROS) e/ou espécies reativas ao nitrogênio (RNS) (EVANS et al., 2003). Exemplos  
1119 de ROS incluem os superóxidos, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio  
1120 (ROSEN et al., 2001). As ROS, induzem injúria endotelial, modificação oxidativa das  
1121 lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e indução de genes sensíveis ao redox  
1122 incluindo proteínas quimioatrativas de monócitos 1 e moléculas de adesão, tais  
1123 como moléculas de adesão de células vasculares (CREAGER et al., 2003).

1124 O EO pode ser amplificado pelo ciclo auto-catalítico de estresse metabólico,  
1125 dano tecidual e morte celular, os quais conduzem a um aumento simultâneo na  
1126 produção de radicais livres e comprometimento do mecanismo inibidor, o que agrava  
1127 ainda mais essa situação (BAYNES, 1991).

1128 Ele desempenha um papel primordial no desenvolvimento das complicações  
1129 do diabetes, ambos a nível microvascular e cardiovascular (GIACCO; BROWNLEE,  
1130 2010). As anormalidades metabólicas do diabetes causam superprodução  
1131 mitocondrial de superóxido nas células endoteliais dos pequenos e grandes vasos e  
1132 também no miocárdio (GIACCO; BROWNLEE, 2010).

1133 O aumento da produção de superóxido causa a ativação das cinco principais  
1134 vias envolvidas nessa patogênese que são: via de fluxo poli-ol, aumento da formação  
1135 de produtos finais de glicação avançada (AGES), aumento da expressão de  
1136 receptores para AGES e ativação do seu ligante, ativação de isoformas da proteína  
1137 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  $\beta$  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 Conseqüentemente, ocorre o aumento nos níveis de sorbitol, AGE e PKC. Portanto,  
1162 o efeito da hiperglicemia na formação de ROS e na ativação de NK-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

1171 e diabetes tipo dois, no entanto, seu papel na fisiopatologia não tem sido  
1172 estabelecido (PURVES et al., 2001)

1173 Estresse oxidativo crônico ou excessivo pode interferir com a função normal  
1174 dos tecidos afetados pela hiperglicemia diabética, tanto pelo aumento do fluxo  
1175 sanguíneo e distúrbio na hemodinâmica da retina (KOWLURU; KENNEDY, 2001),  
1176 quanto pela contratilidade da vasculatura do músculo liso (SHARPE et al., 1998) e  
1177 diminuição da condutividade neural nos nervos periféricos (HOUNSOM et al., 2001).  
1178 Estudos têm comparado a retinopatia diabética a doenças inflamatórias crônicas de  
1179 baixo nível, em que os capilares da retina tornam-se não perfundidos e isquêmicos e  
1180 o número de trombos de plaqueta de fibrina elevados (JOUSSEN et al., 2001).

1181 Um mecanismo patogênico associado ao diabetes e à hiperglicemia seria a  
1182 desregulação dos níveis de espécies ativas de oxigênio, especialmente do radical  
1183 superóxido (GOTTLIEB et al., 2009). No caso, a hiperglicemia induziria um processo  
1184 de superprodução de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons da  
1185 mitocôndria. Quando ocorre aumento na diferença de potencial eletroquímico  
1186 (gradiente de próton) produzida na membrana interna da mitocôndria, o tempo de  
1187 vida das moléculas que levam à produção do ânion superóxido também aumenta.  
1188 Este prolongamento na manutenção destas moléculas tem como consequência a  
1189 elevação nos níveis de superóxido (GOTTLIEB et al., 2009).

1190 Deste modo, a hiperglicemia induz a uma grande produção do ânion  
1191 superóxido, o qual causa estresse oxidativo. Assim, parece que o estresse oxidativo  
1192 promove um ambiente favorável para o desenvolvimento do diabete e vice versa,  
1193 uma vez que hiperglicemia aumenta esse fator, o que pode levar à aterosclerose  
1194 (GOTTLIEB et al., 2009). Além disso, o EO contribui para aterogênese induzindo a  
1195 lipoperoxidação e a expressão de várias citoquinas e moléculas de adesão  
1196 (GOTTLIEB et al., 2009).

1197 Muitas fontes de ROS contribuem para o aumento do estresse oxidativo, no  
1198 entanto NADPH oxidase e suas subunidades catalíticas é a única família de enzimas  
1199 conhecidas dedicada exclusivamente à produção de ROS (LALEU et al., 2010;  
1200 JIANG et al., 2012). Além disso, suas isoformas estão aumentadas na presença de  
1201 glicose elevada, tornando este família de enzimas um excelente candidato para  
1202 serem tratadas nas desordens vasculares do diabetes (AOYAMA et al., 2012).  
1203 Várias isoformas da NADPH oxidase estão presentes na vasculatura, a 1, a 2, a 4, e

1204 a 5. Estas isoformas foram propostas para desempenhar um papel importante na  
1205 fisiopatologia vascular, induzindo tanto a inflamação quanto fibrose (SOURRIS et al.,  
1206 2010).

1207 A consequência mais estudada do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica  
1208 (LEITE; SARNI, 2003). Ela pode ser definida como uma cascata de eventos  
1209 bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre os lípidos insaturados das  
1210 membranas celulares, gerando principalmente radicais alquilas, alcóxilas e peróxilas,  
1211 levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de  
1212 metabólitos e, numa condição extrema, morte celular (BENZIE, 1996).

1213 A formação de radical peróxil danifica diretamente a membrana celular por  
1214 modificações em sua fluidez, permeabilidade e integridade. Para a avaliação desse  
1215 evento o método mais frequente utilizado é a medida de substâncias reativas ao  
1216 ácido tiobarbitúrico (TBARS) (LEITE; SARNI, 2003). Níveis elevados de TBARS têm  
1217 sido identificados em pacientes críticos com sepse e falência de múltiplos órgãos  
1218 (LEITE; SARNI, 2003). Além disso, ela desempenha um importante papel na  
1219 aterosclerose e complicações do diabetes mellitus (JAIN; LEVINE, 1990).

1220 A defesa do organismo contra espécies reativas ao oxigênio vai desde a  
1221 prevenção à formação das ROS, interceptação dos radicais formados, a reparo das  
1222 células danificadas (ROSA, 2013). Os sistemas que previnem a formação são  
1223 considerados biomoléculas ligantes de metais ( $Fe^{2+}$  e  $Cu^+$ ), ou seja, são quelantes  
1224 (ROSA, 2013). A presença de proteínas quelantes é de vital importância para os  
1225 seres vivos, pois previne as células de processos oxidativos catalisados por íons  
1226 metálicos (ROSA, 2013).

1227 As enzimas que controlam os níveis de ROS são Glutathiona peroxidase  
1228 (GPx), Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT), sendo sua ação a  
1229 desativação das espécies reativas de forma a impedir a oxidação posterior de outras  
1230 moléculas (ROSA, 2013). A desativação final de um composto com um ou mais  
1231 elétrons não emparelhados consiste na formação de outro produto não radical  
1232 (ROSA, 2013). O antioxidante mais eficiente deve combinar propriedades como  
1233 reagir com radicais livres tais como o peróxil (ROO) e posteriormente reagir com  
1234 compostos hidrossolúveis para sua própria regeneração (HALLIWELL, 2007). Os  
1235 compostos hidrossolúveis transferem a função radical para longe do sítio-alvo  
1236 potencial e são chamados de “scavenger” de radicais livres (HALLIWELL, 2007).

1237 A glutathione (GSH) é uma molécula ubíqua produzida intracelularmente em  
1238 todos os órgãos e tipos celulares, porém, mais abundante no fígado e pulmões  
1239 (MONTEIRO, 2012). Em torno de 85 a 90% estão livremente distribuídos no  
1240 citoplasma, no entanto podem estar também compartimentalizados em organelas  
1241 como mitocôndrias, peroxissomos, matriz nuclear, e retículo endoplasmático  
1242 (MONTEIRO, 2012). Como maior antioxidante intracelular do organismo, a depleção  
1243 do GSH pode ser tanto causa como pré-requisito para formação de ROS (FRANCO  
1244 et al., 2007).

1245 Ela é um tripeptídeo composto pelos aminoácidos glutamina, cisteína e  
1246 glicina. Sua síntese requer a ação consecutiva de duas enzimas a  $\gamma$ -glutamylcisteína  
1247 ( $\gamma$ -CGS) e a glutathione sintetase (GSS) (MONTEIRO, 2012). A GSH também pode  
1248 ser sintetizada por meio de vias de recuperação que envolvem seu catabolismo ou  
1249 por intermédio de reciclagem após sua oxidação pela enzima glutathione redutase  
1250 (FRANCO et al., 2007). Além disso, ela detoxifica uma série de compostos por meio  
1251 da enzima glutathione S-transferase (GST) e das glutathione peroxidases (GPXs)  
1252 (MONTEIRO, 2012).

1253 Estudos mostraram que o DM causa profundas alterações no metabolismo e  
1254 transporte do GSH, que medeia o estado redox da célula (MONTEIRO, 2012).  
1255 Diversas complicações do diabetes mellitus como lesões nervosas periféricas,  
1256 malformações fetais e angiopatias têm sido associado à depleção do GSH e,  
1257 consequentemente a formação de substâncias reativas ao oxigênio (FRANCO et al.,  
1258 2007). Além disso, foi demonstrado que sua concentração apresentou-se  
1259 diminuída em pacientes com DM e complicações microvasculares, correlacionando-  
1260 se diretamente com o controle glicêmico (DINCER; ALADEMIR; ILKOVA, 2002).

1261 Estudos em humanos sugeriram que terapia antioxidante com vitamina E  
1262 podem normalizar a hemodinâmica da retina, conhecido por ser afetado na pré-  
1263 clínica da retinopatia e também pode ser importante terapeuticamente na alteração  
1264 do curso da retinopatia diabética (CLERMONT, 1998). Estudos in vitro com modelo  
1265 animal de diabetes têm mostrado que antioxidantes, especialmente o ácido  $\alpha$  lipóico  
1266 melhora a sensibilidade a insulina (MADDUX et al., 2001; PACKER et al., 2000).

1267 Kowluru et al. (2001), em estudo com ratos diabéticos que receberam dieta  
1268 suplementada com antioxidante durante longo tempo (entre 12 e 18 meses),

1269 mostraram que houve uma inibição dos estágios iniciais da retinopatia diabética e os  
1270 mecanismos pelo qual ela age.

1271 Vários ensaios clínicos embora pequenos e de curta duração, também  
1272 demonstraram que o tratamento com vitamina E, vitamina C ou glutatona melhora a  
1273 sensibilidade à insulina em indivíduos com resistência à insulina e ou pacientes com  
1274 diabetes tipo dois (EVANS; GOLDFINE, 2000). No entanto, de acordo com Ozguner;  
1275 Bardak; Comlekci (2006) o tratamento com melatonina na dosagem de  $100\mu\text{g Kg}^{-1}$   
1276 em ratos submetidos à radiação eletromagnética reduziu o estresse oxidativo na  
1277 retina. Isso demonstra que a melatonina pode ser um hormônio promissor para o  
1278 tratamento de doenças oculares associadas ao diabetes. Assim, há a necessidade  
1279 de desenvolvimento de modelos experimentais que possam investigar o mecanismo  
1280 de ação da melatonina nas patologias oculares, principalmente na retinopatia  
1281 diabética.

1282

## 1283 **2.11. Citocinas inflamatórias envolvidas na retinopatia diabética**

1284

1285 A patogênese do diabetes mellitus é vista como um processo multifatorial  
1286 (CHERNYKH et al., 2014). Essa patogenicidade ocasiona distúrbios metabólicos  
1287 vasculares locais e sistêmicos as quais levam ao aparecimento de lesões na visão  
1288 (CHERNYKH et al., 2014).

1289 A literatura mostra que pacientes com RD apresentaram ativação de reações  
1290 inflamatórias, violação do estado funcional do sistema imune e também desequilíbrio  
1291 nos processos de intercelulares indutores de citocinas, matriz de metaloproteinase,  
1292 fatores de crescimento e outros elementos (KHODJAEV et al., 2011). Identificar  
1293 essas desordens indica sua absoluta importância na patogênese da RD  
1294 (KHODJAEV et al., 2011).

1295 A inflamação crônica é caracterizada por aumento da permeabilidade  
1296 vascular, edema, infiltração celular, liberação de citocinas, destruição tissular,  
1297 neovascularização e tentativa de reparo (SERRARBASSA; DIAS; VIEIRA, 2008). A  
1298 retinopatia diabética exhibe a maioria destas alterações. A microglia está intimamente  
1299 associada com neurônios que exprimem moléculas que regulam negativamente a  
1300 ativação microglial através de seus respectivos receptores. Logo, uma alteração  
1301 dessa regulação durante o estresse poderia ativar a microglia para produzir citocinas

1302 inflamatórias (SCHRODER; PALINSKI; SCHMID-SCHONBEIN, 1991). A microglia  
1303 ativada produz substâncias que induzem a adesão de moléculas, as quais podem  
1304 promover o acúmulo de neutrófilos no endotélio induzindo o extravasamento de  
1305 macrófagos (CAICEDO et al., 2005).

1306 Os processos fisiológicos de reparo que auxiliam as células retinianas a  
1307 sobreviverem ao estresse incluem a liberação aumentada de diversos fatores de  
1308 crescimento e citocinas, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF),  
1309 IGF-1, interleucina-1 e fator de necrose tumoral (TNF) (SERRARBASSA; DIAS;  
1310 VIEIRA, 2008). Estas proteínas que têm sido implicadas no desenvolvimento da RD,  
1311 também provêm funções neurotróficas para apoiar a sobrevivência das células da  
1312 retina (GARIANO; GARDNER, 2005). O aumento da liberação de citocinas pode  
1313 servir como uma função adaptativa para manter a função neuronal mas, ao mesmo  
1314 tempo se a liberação for exagerada, causa dano vascular progressivo resultando em  
1315 edema macular e neovascularização (GARIANO; GARDNER, 2005). Assim, este  
1316 ciclo vicioso perpetua tanto o dano vascular como o neural e culmina nas  
1317 características clínicas da RD (ANTONETTI et al., 2006).

1318

### 1319 **2.11.1. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)**

1320

1321 O VEGF pertence a um grupo de glicoproteínas diméricas que inclui o fator de  
1322 crescimento placentário (PLGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, e  
1323 VEGF-F (CAPP et al., 2009). O VEGF-A é uma citocina potente e multifuncional que  
1324 exerce seu efeito no endotélio, sendo o mais bem estudado e compreendido  
1325 (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997). O VEGF-B está envolvido na angiogênese  
1326 embrionária, especificamente no tecido do miocárdio (GOLOGORSKY; THANOS;  
1327 VAVVAS, 2012). O tipo C é o principal fator originador da vasculatura linfática, e o  
1328 VEGF-D é necessário para o desenvolvimento da vasculatura linfática bronquiolar  
1329 (GOLOGORSKY; THANOS; VAVVAS, 2012). O tipo E é achado em vírus e o PLGF  
1330 é importante na vasculogênese, além de desempenhar um papel na angiogênese  
1331 como na isquemia induzida, bem como na inflamação e a cicatrização de feridas  
1332 (GOLOGORSKY; THANOS; VAVVAS, 2012).

1333 Essa citocina atua direta e seletivamente através dos receptores VEGFR-1 e  
1334 VEGFR-2, expressados predominantemente, no endotélio vascular (DVORAK et al.,

1335 1995). A ligação do VEGF a esses receptores causa influxo de cálcio citoplasmático,  
1336 aumentando sua concentração em até quatro vezes, mudança da forma, divisão e  
1337 migração celular (DAWSON et al., 2006). Esse aumento da permeabilidade das  
1338 vênulas às macromoléculas permite que proteínas plasmáticas extravasem para o  
1339 espaço extravascular, levando a coagulação do fibrinogênio e deposição de gel de  
1340 fibrina que serve como matriz provisória para o crescimento de novos vasos  
1341 sanguíneos (FERRARA, 2004). O aumento da permeabilidade microvascular parece,  
1342 invariavelmente, preceder e/ou acompanhar a angiogênese numa variedade de  
1343 processos fisiológicos e patológicos, fazendo com que o VEGF seja um importante  
1344 mediador de angiogênese (NAGY et al., 2008).

1345 Michaelson em 1948 postulou a existência de um fator angiogênico difusível,  
1346 liberado pela retina isquêmica. Por ser induzido por hipóxia, o VEGF tornou-se um  
1347 forte candidato como mediador de neovascularização intraocular patológica  
1348 (VALIATTI et al., 2011). Além disso, em pacientes com diabetes mellitus e  
1349 retinopatia diabética proliferativa, foram observado que essa citocina apresentava  
1350 níveis maiores no humor aquoso e vítreo do que no plasma, o que possivelmente  
1351 está relacionado com a atividade da RD (FUNATSU et al., 2002).

1352 O aumento dos níveis de VEGF ocular na RD só reforça o papel da  
1353 neovascularização no curso desta doença (GOLOGORSKY; THANOS; VAVVAS,  
1354 2012). Terapias anti-VEGF tem sido alvo de numerosas drogas e ensaios clínicos  
1355 para o tratamento da retinopatia diabética proliferativa (RDP) e edema de macula  
1356 diabético (GOLOGORSKY; THANOS; VAVVAS, 2012).

1357

### 1358 **2.11.2. Interleucina 6 (IL-6) e Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )**

1359

1360 Estudos também têm demonstrado significativo aumento nas concentrações  
1361 IL-6 e TNF- $\alpha$  em pacientes com RDP. Estas observações confirmam a natureza  
1362 inflamatória e imunológica da fisiopatologia dessa enfermidade (GOLOGORSKY;  
1363 THANOS; VAVVAS, 2012).

1364 Isto é significativo, porque o TNF-  $\alpha$  desempenha um importante papel na  
1365 neovascularização e reatividade vascular, em adição as suas atividades pró-  
1366 inflamatórias. Ela também está diretamente envolvida na inflamação por meio de

1367 uma indução de citocinas, envolvimento em quimiotaxia de monócitos, e estimulação  
1368 de moléculas de adesão no endotélio da retina (ELNER et al., 1997).

1369 TNF- $\alpha$  é produzido principalmente por macrófagos, monócitos e células T  
1370 (DONG et al., 2007). Ela desencadeia a via extrínseca da apoptose e age através  
1371 dos seus dois receptores primários, TNFR1 (P55) e TNFR2 (p75) (BERGER et al.,  
1372 2008). Além disso, ela tem um papel significativo na função e morfologia nos danos  
1373 da retina após injúria isquêmica, agindo através dos seus receptores (MARCHETTI  
1374 et al., 2004).

1375 A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina com atuação tanto na resposta imune  
1376 inata como na adaptativa (GOMES; NETO; BISPO, 2009). Ela é sintetizada por  
1377 monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a  
1378 microrganismos e também à estimulação por outras citocinas, principalmente  
1379 interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF-  $\alpha$ ) (SOUZA et al., 2008).

1380 Além disso, a IL-6 se constitui em um importante marcador inflamatório, tal  
1381 como seu receptor (gp 130), é amplamente expresso durante reações inflamatórias  
1382 produzindo efeitos indesejáveis em vários órgão (TONET et al., 2008).

1383 Essa citocina normalmente é expressa em baixos níveis, exceto durante  
1384 infecção, trauma ou outros fatores estressantes (SOUZA et al., 2008). Entre os  
1385 vários fatores que regulam a expressão do gene da IL-6, estão o estrógeno e a  
1386 testosterona (GOMES; NETO; BISPO, 2009). Após a menopausa ou a andropausa,  
1387 os níveis de IL-6 são elevados mesmo na ausência de infecção, trauma ou estresse  
1388 (ERSHLER; KELLER, 2000). A própria hiperglicemia característica da intolerância à  
1389 glicose tem relação com a síntese imediata de marcadores como a IL-6, com  
1390 variações nos níveis séricos positivamente relacionados e com aumentos mais  
1391 significativos na hiperglicemia em pulsos, situação comum no diabético (SOUZA et  
1392 al., 2008). Chernykh e colaboradores 2014, relataram que a concentração de IL-6  
1393 no vítreo de pacientes com deslocamento de retina e retinopatia diabética  
1394 proliferativa, foi significativamente maior (1,9 vezes), do que o índice de doentes  
1395 sem sinais de RDP. No entanto, o papel da IL-6 no tecido nervoso é intrigante uma  
1396 vez que tanto aumenta o dano agudo, aumentando a inflamação neural, quanto  
1397 fornece neuroproteção, promovendo a expressão de fatores neurotróficos (SUZUKI;  
1398 TANAKA; SUZUKI, 2009).

1399

1400

### 1401 3. REFERÊNCIAS

1402

1403 ABHARY, S.; HEWITT, A. W.; BURDON, K. P.; CRAIG, J. E. A systematic  
1404 metaanalysis of genetic association studies for diabetic retinopathy. **Diabetes**, n. 58,  
1405 p. 2137-2147, 2009.

1406 ADKINS, E. A.; HENDRIX, D. V. H. Outcomes of dogs presented for cataract  
1407 evaluation: a retrospective study. **JAAHA**, v. 41, p.235-240, 2005.

1408 AIELLO, L. P. Angiogenic pathways in diabetic retinopathy. **Engl. J. Med**, v.353, n. 8,  
1409 p. 839-841, 2005.

1410 ALZAID, A. A. Insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Acta**  
1411 **Diabetologica**, v. 33, n. 2, p. 87-99, 1996.

1412 AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes  
1413 mellitus. **Diabetes Care**, v. 31, n. 1, p. 55-60, 2008.

1414 AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes—  
1415 2014. **Diabetes Care**. v. 37, n.1, p.14-80, 2014.

1416 ANTONETTI, D. A.; BARBER, A. J.; BRONSON, S. K.; FREEMAN, W. M.;  
1417 GARDNER, T. W.; JEFFERSON, L. S.; KESTER, M.; KIMBALL, S. R.; KRADY, J. K.;  
1418 LANOUE, K. F.; NORBURY, C. C.; QUINN, P. G.; SANDIRASEGARANE, L.;  
1419 SIMPSON, I. A. JDRF Diabetic Retinopathy Center Group. Diabetic retinopathy:  
1420 seeing beyond glucose-induced microvascular disease. **Diabetes**, v. 55, n. 9, p.  
1421 2401-2411, 2006.

1422 ANWAR, M. M.; MEKI, A. R. M. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic  
1423 rats: effects of garlic oil and melatonin. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr.**  
1424 **Physiol**, v. 135, p. 539–547, 2003.

1425 AOYAMA, T.; PAIK, Y. H.; WATANABE, S.; LALEU, B.; GAGGINI, F.; FIORASO-  
1426 CARTIER, L.; MOLANGO, S.; HEITZ, F.; MERLOT, C.; SZYNDRALEWIEZ, C.;  
1427 PAGE, P.; BRENNER, D. A. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase  
1428 (nox) in experimental liver fibrosis: Gkt137831 as a novel potential therapeutic agent.  
1429 **Hepatology**, v. 56, n. 6, p. 2316-2327, 2012.

1430 BABA, K.; BENLEULMI-CHAACHOUA, A.; JOURNÉ, A. S.; KAMAL,  
1431 M.; GUILLAUME, J. L.; DUSSAUD, S.; GBAHOU, F.; YETTOU, K.; LIU,  
1432 C.; CONTRERAS-ALCANTARA, S.; JOCKERS, R.; TOSINI, G. Heteromeric  
1433 MT1/MT2 melatonin receptors modulate photoreceptor function. **Sci. Signal**, v. 6, n.  
1434 296,p. 89, 2013.

1435 BAGI, Z.; FEHER, A.; BELEZNAI, T. Preserved coronary arteriolar dilatation in  
1436 patients with type 2 diabetes mellitus: implications for reactive oxygen species.  
1437 **Pharmacol Report**. v. 38, n. 61, p. 99-104, 2009.

1438 BARBER, A. J. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of  
1439 the eye. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**. v.27, n. 2, p. 283-90,  
1440 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

- 1484 BRASIL, O. M.; BRASIL, O. F. M. Análise comparativa da cirurgia do buraco macular  
1485 associada à remoção da membrana limitante interna com e sem coloração pela  
1486 indocianina verde. **Arq. Bras. Oftalmol**, v. 69, n. 2, p. 157-160, 2006.
- 1487  
1488 BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism.  
1489 **Diabetes**, v. 54, n. 56, p.1615–25, 2005.
- 1490  
1491 BRZEZINSKI, A. Melatonin in humans. **N. Engl. J. Med**, v. 336, p. 186–195, 1997.
- 1492 BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism.  
1493 **Diabetes**, v. 54, n. 56, p.1615–25, 2005.
- 1494  
1495 BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H.; KJOS, S. L.; WATANABE, R. M. What is  
1496 gestational diabetes? **Diabetes Care**, v. 30, n. 2, p.105-111, 2007.
- 1497 BUONFIGLIO, D. C.; PELICIARI-GARCIA, R. A.; AMARAL, F. G.; PERES, R.;  
1498 NOGUEIRA, T. C. A.; AFECHE, S. C.; CIPOLLA-NETO, J. Early-Stage Retinal  
1499 Melatonin Synthesis Impairment in Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats.  
1500 **IOVS**, v. 52, n. 10, 2011.
- 1501 BURNS, M. E.; MENDEZ, A.; CHEN, J.; BAYLOR, D. A. Dynamics of Cyclic GMP  
1502 Synthesis in retinal rods. **Neuron**, v. 36, p. 81-91, 2002.
- 1503 CAICEDO, A.; ESPINOSA-HEIDMANN, D. G.; PIÑA, Y.; HERNANDEZ, E. P.;  
1504 COUSINS, S. W. Blood-derived macrophages infiltrate the retina and activate Muller  
1505 glial cells under experimental choroidal neovascularization. **Exp Eye Res**, v. 81, n.1,  
1506 p. 38-47, 2005.
- 1507  
1508 CAPP, C.; ZENNIG, N.; WAJNER, S.; MAIA, A. L. Papel do fator de crescimento  
1509 endotelial vascular nos carcinomas de tireóide. **Rev. HCPA**, v. 29, n. 1, p. 51-59,  
1510 2009.
- 1511 CHEUNG, N., MITCHELL, P. WONG, T. Y. Diabetic retinopathy. **Lancet**, n. 376, p.  
1512 124-136, 2010.
- 1513 CHERNYKH, V.; SMIRNOV, E.; VARVARINSKY, Y.; CHERNYKH, D.; OBUKHOVA,  
1514 O.; TRUNOV, A. IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A and vascular endothelial growth factor in  
1515 the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy *Advances in Bioscience*  
1516 and **Biotechnology**, v. 5, p. 184-187, 2014.
- 1517 CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S. C.; Glândula pineal in: Aires, M.M (Ed.). *Fisiologia*.  
1518 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. p. 981-990.
- 1519 CLERMONT, A. C.; AIELLO, L. P.; AIELLO, L. M.; SCHLOSSMAN, D.; KOPPLE, A.;  
1520 KING, G. L.; BURCELL, S. E. Vitamin E normalized retinal blood flow in diabetic  
1521 patients with minimal diabetic retinopathy: results of a double masked crossover  
1522 clinical trial (Abstract). **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, v. 39, n. 4, p. 1000, 1998.
- 1523 CORMACK, D. H. **Fundamentos de histologia**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.  
1524 p.90-93, 1996.
- 1525  
1526 COSTA, R. A.; JORGE, R.; CALUCCI, D.; MELO, L. A. JR.; CARDILLO, J. A.;  
1527 SCOTT, I. U. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for central and hemicentral retinal  
1528 vein occlusions: IBeVO study. **Retina**, v. 27, n. 2, p. 141–149, 2007.
- 1529

- 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 HISTOFISIOLÓGICOS 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

1574 hyperpermeability, and angiogenesis. **Am. J. Pathol**, v.146, n. 5, p. 1029-1039,  
1575 1995.

1576 DONG, X.; SWAMINATHAN, S.; BACHMAN, L. A.; CROATT, A. J.; NATH, K. A.;  
1577 GRIFFIN, M. D. "Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in  
1578 early renal ischemiareperfusion injury," **Kidney Inter**, v. 71, n. 7, p. 619–628, 2007.  
1579

1580 DUBOCOVICH, M. L.; MASANA, M. I.; IACOB, S.; SAURI, D. M. Melatonin receptor  
1581 antagonista that differentiate between the human Mel 1a and Mel 1b recombinant  
1582 subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1  
1583 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, v. 355, n.  
1584 3, p. 365-375, 1997.

1585 ELNER, S. G.; ELNER, V. M.; BIAN, Z. M.; LUKACS, N. W.; KURTZ, R. M.;  
1586 STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. Human retinal pigment epithelial cell interleukin-8  
1587 and monocyte chemotactic protein-1 modulation by T-lymphocyte products," **Invest.**  
1588 **Ophthalm. Vis. Sci**, v. 38, n. 2, p. 446–455, 1997.

1589 EVANS, J. L.; GOLDFINE, I. D.; MADDUX, B. A.; GRODSKY, G. M. Are Oxidative  
1590 StressActivated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and-Cell  
1591 Dysfunction? **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2003.

1592 EVANS, J. L.; GOLDFINE, I. D. \_-Lipoic acid: a multi-functional antioxidant that  
1593 improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. **Diabetes. Technol.**  
1594 **Ther**, v. 2, p. 401–413, 2000.

1595 ERSHLER, W. B.; KELLER, E. T. Age-associated increased interleukin-6 gene  
1596 expression, late-life diseases, and frailty. **Annu. Rev. Med**, v. 51, p. 245-70, 2000.

1597 FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES (IDF) acesso em : 16/10/11

1598 FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth  
1599 factor. **Endocr Rev**, v.18, n. 1, p. 4-25, 1997.  
1600

1601 FERRARA N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress.  
1602 **Endocr. Rev**, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.  
1603

1604 FRANCO. R.; SCHONEVELD, O. P.; PAPPA, A.; PANAYIOTIDIS, M. I. The central  
1605 role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. **Arch. Physiol.**  
1606 **Biochem**, v. 113, p. 234-258, 2007.

1607 FUNATSU, H.; YAMASHITA, H.; NOMA, H.; MIMURA, T.; YAMASHITA, T.; HORI, S.  
1608 Increased levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the  
1609 aqueous humor of diabetics with macular edema. **Am. J. Ophthalmol**, v.133, n. 1,  
1610 p.70-77, 2002.

1611 GARDNER, T. W.; LIETH, E.; KHIN, S. A.; BARBER, A. J.; BONSALE, D. J.;  
1612 LESHER, T.; RICE, K.; BRENNAN, W. A. Astrocytes increase barrier properties and  
1613 ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**,  
1614 v. 38, n. 11, p. 2423-2427, 1997.

1615 GARDNER, T. W.; ANTONETTI, D. A.; BARBER, A. J.; LANOUE, K. F.; LEVISON,  
1616 S.W. Diabetic retinopathy: more than meets the eye. **Surv. Ophthalmol**, v. 47, n. 2,  
1617 p. 253-262, 2002.  
1618

- 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.; MACKKEY, 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 Mellito: 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 tolerande. 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  $\beta$ -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  $\alpha$ -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- $\kappa$ 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 PÖEGGELER, B.; HARDELAND, R. Melatonin: Nature's most versatile biological  
 1924 signal? **FEBS. J.** v. 273, n. 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. 5ª 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.; EKBLUM, 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 Electroretinographic 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

2168

2169

2170 Potencial terapêutico da melatonina sobre o estresse oxidativo (retina e pâncreas),

2171 histopatologia e atividade elétrica na retina em ratos com retinopatia diabética

2172

2173 Ismaela Maria Ferreira de Melo<sup>1</sup>, Cíntia Giselle Martins Ferreira<sup>1</sup>, Elton Hugo Lima da Silva

2174 Souza<sup>1</sup>, Telga Lucena Alves Craveiro de Almeida<sup>1</sup>, Leucio Duarte Vieira Filho<sup>2</sup>, Fabrício

2175 Bezerra de Sá<sup>1</sup>, Valéria Wanderley Teixeira<sup>1</sup>, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira<sup>1\*</sup>

2176

2177

2178 <sup>1</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia

2179 Animal, Recife, Brasil

2180 <sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro

2181 de Ciências Biológicas, Recife, Brasil

2182

2183

2184

2185

2186 \*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois

2187 Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389E-mail:

2188 teixeira.alvaro@outlook.com (TEIXEIRA, A.A.C.)

2189 **Resumo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da melatonina quando administrada  
2190 simultaneamente e após indução ao diabetes, sobre o estresse oxidativo (retina e pâncreas),  
2191 histopatologia e atividade elétrica da retina em ratos com retinopatia diabética. Utilizou-se 50  
2192 ratos divididos nos seguintes grupos: **GC:** ratos sem indução ao diabetes pela  
2193 estreptozotocina; **GD:** ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com  
2194 placebo; **GDM:** ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e após confirmação do  
2195 diabetes tratados com melatonina na dosagem de 10 mg/kg de peso corporal durante 20 dias;  
2196 **GDMS:** ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e simultaneamente tratados com  
2197 melatonina na dosagem de 10mg/kg durante 20 dias; **GDI:** ratos induzidos ao diabetes pela  
2198 estreptozotocina e após confirmação do diabetes tratados com insulina durante 20 dias. O  
2199 diabetes foi induzido pela administração intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg), e a  
2200 insulina (5 U/dia) foi administrada via subcutânea. O estresse oxidativo pancreático foi  
2201 avaliado através da peroxidação lipídica e níveis de glutathiona reduzida. Para retina foi  
2202 avaliado a produção de ânion superóxidos e atividade elétrica. Os resultados mostraram que  
2203 as retinas do grupo diabético apresentaram desorganização das camadas retinianas,  
2204 microaneurismas, tortuosidades e dilatação vascular, no entanto, exceto no eletrorretinograma,  
2205 a melatonina melhorou todos os parâmetros analisados isso porque ela atuou de forma a  
2206 diminuir o processo inflamatório e regulou os mecanismos que ocasionaram estresse  
2207 oxidativo. Assim, concluímos que a melatonina pode ser um importante fator coadjuvante no  
2208 tratamento da retinopatia diabética principalmente quando administrada simultaneamente à  
2209 indução do diabetes.

2210

2211

2212 **Palavras chave:** Eletrorretinograma, estresse oxidativo, melatonina, ratos, retinopatia  
2213 diabética.

2214 **Abstract:** The purpose of this study was to evaluate the effect of melatonin when  
2215 administered simultaneously and after induction of diabetes, on oxidative stress (retina and  
2216 pancreas), histopathology and electrical activity of the retina in mice with diabetic  
2217 retinopathy. We used 50 rats divided into the following groups: GC: no induction mice  
2218 diabetes by streptozotocin; GD: rats induced by streptozotocin diabetes and treated with  
2219 placebo; GDM: rats by streptozotocin induced diabetes mellitus and after confirmation treated  
2220 with melatonin at dosage of 10 mg / kg body weight for 20 days; GDMS: mice induced by  
2221 streptozotocine diabetes and simultaneously treated with melatonin at a dose of 10mg / kg for  
2222 20 days; GDI: rats by streptozotocin induced diabetes mellitus and after confirmation treated  
2223 with insulin for 20 days. Diabetes was induced by intraperitoneal administration of  
2224 streptozotocin (60 mg / kg) and insulin (5 U / day) was administered subcutaneously. The  
2225 pancreatic oxidative stress was evaluated by lipid peroxidation and reduced glutathione levels.  
2226 To retina was evaluated the production of superoxide anion and electrical activity. The results  
2227 showed that the retinas of diabetic group showed disorganization of retinal layers,  
2228 microaneurysms, tortuosity and vascular dilation, however, except in the electroretinography,  
2229 melatonin improved all parameters analyzed because she acted in order to reduce the  
2230 inflammatory process and regulated the mechanisms that caused oxidative stress. Thus, we  
2231 concluded that melatonin may be an important contributing factor in the treatment of diabetic  
2232 retinopathy especially when administered simultaneously to the induction of diabetes.

2233

2234

2235

2236

2237 **Keywords:** Electroretinogram, oxidative stress, melatonin, mice, diabetic retinopathy

## 2238 **Introdução**

2239

2240 A retinopatia diabética faz parte das complicações microvasculares do diabetes,  
2241 associada à longa duração da doença e ao controle glicêmico inadequado (ALVES et al.,  
2242 2014). Ela é uma microangiopatia que afeta pequenos vasos da retina, arteríolas, capilares e  
2243 vênulas, sendo a lesão vascular a principal causa das complicações que são observadas na  
2244 retina devido ao acúmulo de proteínas glicadas nos tecidos quando a glicose encontra-se em  
2245 concentrações elevadas (MORENO; LOZANO; SALINAS 2013).

2246 Em pacientes diabéticos, as lesões celulares e teciduais podem ser provocadas por um  
2247 aumento na concentração de espécies reativas ao oxigênio ou nitrogênio e isto está  
2248 relacionado a alterações bioquímicas em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, modificando a  
2249 homeostase e função celular, responsáveis pelas alterações fisiopatológicas e complicações  
2250 desta enfermidade (MARITIM; SANDERS; WATKINS 2003). Dessa forma, o estresse  
2251 oxidativo é considerado uns dos principais fatores envolvidos nessa patogênese levando a  
2252 alterações estruturais e funcionais, tais como perda acelerada de células capilares na  
2253 microvasculatura retiniana, aumento na permeabilidade vascular e aumento na formação do  
2254 fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (KOWLURU; CHAN, 2007; KAUR, 2008).

2255 Assim, a hiperglicemia tem um papel crucial na fase inicial da doença, enquanto que o  
2256 estresse oxidativo aumenta o dano tecidual e as complicações diabéticas ao longo dos anos  
2257 (GIACCO; BROWNLEE 2010). A exposição da vasculatura à hiperglicemia e o aumento dos  
2258 ácidos graxos livres característicos do diabetes mellitus e estados de resistência à insulina  
2259 induzem a produção de superóxidos (CAPELLINE et al., 2010). Todavia, o sistema de defesa  
2260 antioxidante tenta neutralizar os efeitos prejudiciais dessas espécies reativas (HALLIWELL;  
2261 GUTTERIDGE 2007). Outro fator relacionado com o estresse oxidativo é a função da  
2262 NADPH oxidase. Ellis et al. (1998) mostraram que sua atividade é aumentada em ratos

2263 diabéticos e que as complicações vasculares ocasionadas pelo estresse são os responsáveis  
2264 pelo aumento desse fator (GRASSI 2003).

2265 Por outro lado, o sistema antioxidante é responsável por manter o equilíbrio entre as  
2266 substâncias pró-oxidantes e antioxidantes as quais o organismo fica exposto. Esse sistema  
2267 compreende enzimas como a superóxido dismutase, catalase, e a glutathione peroxidase  
2268 (HALLIWELL; GUTTERIDGE 1999). Inúmeros estudos demonstraram que a administração  
2269 de antioxidantes exógenos e seus subprodutos, podem auxiliar o sistema antioxidante  
2270 endógeno a combater a injúria celular provocada pelas espécies reativas (EREJUWA et al.,  
2271 2010; NIXDORF; GUTIERREZ, 2010)

2272 A melatonina tem demonstrado ser um potente antioxidante e sequestrador de radicais  
2273 livres (BONNEFONT-ROUSSELOT; COLLINS 2010). Além disso, ela estimula a expressão  
2274 de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase (REITER et  
2275 al., 2001; BAYDAS et al., 2001), ademais, ela está envolvida no controle dos ritmos  
2276 biológicos (ARENDDT, SKENE 2005), na regulação da reprodução (REITER et al., 2009) e na  
2277 imunomodulação (GUERRERO; REITER 2002). Pesquisas mostraram que a melatonina  
2278 reduziu danos na córnea de animais com diabetes induzidos por estreptozotocina (MEHMET  
2279 et al., 2008), e, em um modelo de isquemia induzida, ela bloqueou a apoptose em células do  
2280 epitélio pigmentar mantidas em cultura (OSBORNE et al., 1998).

2281 Sabendo-se que a melatonina é conhecida por ser um dos maiores antioxidantes  
2282 naturais, a presente pesquisa teve o objetivo de testar a hipótese de que a melatonina exógena  
2283 pode neutralizar os efeitos adversos promovidos pelo estresse oxidativo na retinopatia  
2284 diabética.

2285

2286

## 2287 2. Materiais e Métodos

2288

2289 Foram utilizados 50 ratos machos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem  
2290 Wistar, com 90 dias de idade, pesando em torno de  $300 \pm 30$ g, procedentes do Biotério do  
2291 Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de  
2292 Pernambuco. Para isto, este projeto foi submetido ao comitê de ética institucional e aprovado  
2293 sob número de protocolo 23082.022.699/2013 e licença N° 011/2014. Esses animais foram  
2294 mantidos em gaiolas, com alimentação e água *ad libitum*, na temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  e  
2295 iluminação artificial que estabeleceram um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro,  
2296 considerando o período de luz das 06:00 às 18:00h. Os animais foram divididos ao acaso em 5  
2297 grupos, cada um com 10 animais: **GC**: ratos sem indução ao diabetes pela estreptozotocina;  
2298 **GD**: ratos com diabetes induzidos pela estreptozotocina e tratados com placebo; **GDM**: ratos  
2299 induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e após confirmação do diabetes (7° dia) tratados  
2300 com melatonina na dosagem de 10 mg/kg de peso corporal durante 20 dias; **GDMS**: ratos  
2301 induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e simultaneamente tratados com melatonina na  
2302 dosagem de 10 mg/kg de peso corporal durante 20 dias; **GDI**: ratos induzidos ao diabetes pela  
2303 estreptozotocina e após confirmação do diabetes tratados com insulina durante 20 dias.

2304

### 2305 2.1 Indução do diabetes

2306

2307 O diabetes foi induzido pela administração intraperitoneal de solução de  
2308 estreptozotocina (Sigma Chemical Co., USA) após jejum alimentar de 14 horas e confirmado  
2309 no sétimo dia após a aplicação. A estreptozotocina foi diluída em tampão citrato de sódio a 10  
2310 mM e pH 4,5, na dosagem única de 60 mg/kg de peso do animal. Os animais não diabéticos

2311 (grupo controle) receberam da mesma forma, doses equivalentes de solução salina e  
2312 decorridos 30 minutos da administração todos os animais foram alimentados normalmente  
2313 (DALL'AGO et al., 2002). Foram incluídos no estudo apenas animais que apresentaram  
2314 glicose sanguínea acima de 200 mg/dL (Glicosímetro Kit Accu-Chek Activ), exceto do grupo  
2315 controle, para início do tratamento com a melatonina ou insulina.

2316

## 2317 *2.2 Administração da melatonina*

2318

2319 A administração da melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi realizado por meio de  
2320 injeções subcutânea no início da noite (18:00) durante 20 dias (GUVEN et al., 2006) na  
2321 dosagem de 10 mg/kg (SUDNIKOVICH et al., 2007). A melatonina foi dissolvida em etanol  
2322 e diluída em salina na proporção de 1:9 (OZGUNER; BARDAK; COMLEKCI 2006).

2323

## 2324 *2.3 Administração de insulina*

2325

2326 A insulina foi administrada por via subcutânea durante 20 dias, na dose de 5 U/dia,  
2327 sendo duas unidades de insulina às 10 h e 3 unidades restantes às 19 h (PINHEIRO et al.,  
2328 2011).

2329

## 2330 *2.4 Dosagem de insulina*

2331

2332 As amostras de sangue foram coletadas nos períodos antes da indução, 10 e 20 dias após  
2333 tratamento. Para isso, os ratos foram imobilizados em contensor mecânico e o sangue coletado  
2334 por punção da veia caudal lateral com uso de cateter (24G) (PEREIRA 2001). Após  
2335 centrifugação refrigerada, o plasma foi acondicionado em microtubos, em duplicata, e  
2336 congelado a -20°C até o momento das dosagens (TEIXEIRA et al., 2004). A insulina  
2337 plasmática foi determinada pelo método de ELISA utilizando "kit" comercial específico para  
2338 rato (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA - EUA).

2339

#### 2340 *2.5 Exame histopatológico da retina*

2341

2342 Os animais dos grupos experimentais foram anestesiados com cloridrato de cetamina  
2343 (80 mg/kg) e xilazina (6,0 mg/kg) por via intramuscular e em seguida foi feita a enucleação  
2344 do olho direito, no qual foi feita uma incisão na córnea para penetração do fixador, após isso  
2345 eles foram eutanasiados com tiopental sódico 100 mg/kg. O material foi fixado em formol  
2346 tamponado por 48 h e posteriormente, processado para inclusão em parafina. Os cortes foram  
2347 submetidos as colorações hematoxilina eosina, para análise histopatológica em microscópio  
2348 de luz, da marca OLYMPUS BX-49.

2349

#### 2350 *2.6 Produção de ânions superóxido e atividade da NADPH oxidase*

2351

2352 Ânions superóxidos ( $O_2^-$ ) foram medidos na retina de 5 ratos de cada grupo  
2353 experimental, totalizando 25 amostras. Os tecidos foram homogeneizados em tampão RIPA  
2354 (50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% triton X-100, 1% desoxicolato, SDS a  
2355 1% suplementado com um coquetel inibidor de protease), numa proporção de 1 g de tecido  
2356 para cada 7 mL de volume. O homogeneizado foi centrifugado (NT805, Novatecnica,

2357 Piracicaba, SP) a 12000 x g 4°C durante 12 minutos. O sobrenadante foi diluído em tampão  
2358 fosfato salino (PBS, pH 7,4), numa proporção de 1:10 mL. Resumidamente, a solução foi  
2359 aquecida a 37 °C e quimioluminescência foi medida durante 10 minutos (Varioskan Flash,  
2360 Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia), após a adição de 10 µM lucigenina. A  
2361 quimioluminescência foi medida na ausência e na presença de 100 µM de NADPH. Os  
2362 ensaios foram realizados em triplicata (ATTIA et al., 2001).

2363

### 2364 *2.7 Marcadores de estresse oxidativo no pâncreas*

2365

2366 O estresse oxidativo pancreático foi avaliado através da mensuração da peroxidação  
2367 lipídica e dos níveis de glutathiona reduzida. A peroxidação lipídica foi estimada através da  
2368 medida dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (OHKAWA; OHISHI;  
2369 YAGI 1979) enquanto a glutathiona reduzida foi determinada através da mensuração de  
2370 grupamentos sulfidrilas não proteicos (SEDLAK; LINDSAY 1968). Para isso, fragmentos do  
2371 pâncreas foram macerados em KCl, 1, 15%, numa proporção de 10 mL/1g, até completa  
2372 homogeneização do material coletado. O homogenato foi transferido para um tubo de ensaio,  
2373 ao qual foi adicionado 2 mL do reagente (0,375% ácido tiobarbitúrico e 75% ácido  
2374 tricloroacético) para cada mL da mistura. Os tubos em duplicata foram lacrados e aquecidos  
2375 em banho maria (100 °C) durante 15 minutos. O sobrenadante foi separado, e a absorvância  
2376 medida a 535 nm (BUEGE; AUST 1978).

2377

### 2378 *2.8 Eletrorretinograma*

2379

2380 O sistema utilizado foi o da Nihon Kohdem, Neuropack 2 MEB-7102A/k, com o seu  
2381 sinal digitalizado pelo DATAQ® DI-158U através de um cabo RS232 com três canais. O foto  
2382 estimulador, com uma luz de Light-emitting diode (LED) de cor branca 7000 k e uma  
2383 angulação de 20 °. Os eletrodos utilizados, foram subdérmicos da Ambu® modelo Neuroline

2384 subdermal 12x0.40 mm e o eletrodo de córnea da Universo SA, modelo ERG-jet™  
2385 conectados ao Electrode Junction Box JB-711B do Neuropack 2 MEB-7102A/k. Para a  
2386 realização do exame os animais foram contidos manualmente, e os olhos vedados e mantidos  
2387 em ambiente escuro por 20 minutos para posterior realização dos estímulos em ambiente  
2388 escotópico. Após 15 minutos de adaptação em ambiente com luz vermelha foi feita a sedação  
2389 com sulfato de quetamina (20 mg/Kg) por via intramuscular; passados cinco minutos foi  
2390 instilada colírio anestésico corneal com cloridrato de proximetacaína 0,5% e lubrificação com  
2391 metilcelulose 2%, posteriormente iniciou-se o exame. Os ERGs foram registrados a partir de  
2392 duas colocações monopolares de eletrodos, sendo um colocado 0,5 cm da comissura temporal  
2393 (eletrodo referência) e outro entre os olhos do animal (eletrodo terra). O eletrodo corneal  
2394 monopolar (DTL) ativo foi colocado sobre a córnea do olho a ser examinado. Para o teste de  
2395 bastonetes realizou-se um estímulo luminoso de  $100 \text{ mcd/m}^{-2}$ , com frequência de 0,2 Hz,  
2396 totalizando quatro estímulos. No teste cones mais bastonetes após 10 minutos de adaptação ao  
2397 claro, foi realizado um estímulo luminoso de  $3000 \text{ mcd/m}^{-2}$  em uma frequência de 0,1 Hz,  
2398 sendo um total de cinco estímulos. Após a adaptação ao ambiente com luz (10 minutos há  
2399  $30000 \text{ mcd/m}^{-2}$ ), foram realizados os testes fotópicos, com estímulo luminoso de  $3000 \text{ mcd/m}^{-2}$   
2400  $^2$ , em uma frequência de 2 Hz, sendo um total de cinco estímulos. Em seguida realizou-se o  
2401 flicker, com estímulo luminoso de  $3000 \text{ mcd/m}^{-2}$ , em uma frequência de 30 Hz. Os resultados  
2402 foram gerados e impressos pelo aparelho utilizado no exame, e avaliados considerando as  
2403 amplitudes em microvolts ( $\mu\text{V}$ ) e latências (tempo implícito) em milissegundos (ms). O tipo  
2404 de estudo utilizado foi o observacional transversal, com a demonstração do eletrorretinograma  
2405 em ambiente escotópico e fotópico sob o estímulo de luz branca.

2406

2407 *2.9 Histoquímica com peroxidase de rábano*

2408

2409 Para demonstração dos vasos da retina, os animais dos grupos experimentais foram  
2410 anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6,0 mg/kg), em seguida foi administrado 25  
2411 mg de peroxidase de rábano diluído em 0,3 ml de soro fisiológico pela veia cava caudal e foi  
2412 aguardado 15 minutos para eutanásia e enucleação dos olhos. A eutanásia foi feita com  
2413 tiopental sódico 100 mg/kg e os olhos enucleados foram imersos em 0,1 M de PBS (pH 7,2-  
2414 7,4). Em seguida, as retinas foram dissecadas como peças inteiras, fazendo quatro radial  
2415 cortes na retina superior, inferior, temporal e nasal. Logo após, elas foram fixadas durante  
2416 uma hora em paraformaldeído a 4%, lavadas em PBS, reagidas com a reação de Hanker-Yates  
2417 modificado (LINDEN; PERRY, 1983). Finalmente, as retinas foram lavadas e montadas com  
2418 lâminas com uma pequena quantidade de uma solução de anti-fading (500 ml Glicerina, 500  
2419 ml Tampão carbonato de sódio e 0,04g P-fenilenodiamino).

2420

#### 2421 *2.10 Níveis glicêmicos*

2422

2423 A glicemia dos animais foi monitorada durante o período experimental, sendo medida  
2424 com o auxílio de um Glicosímetro Kit Accu-Chek Activ, nos momentos antes da indução,  
2425 confirmação do diabetes, 10 e 20 dias das administrações de melatonina ou insulina.

2426

#### 2427 *2.11 Análise estatística*

2428

2429 Os dados da quantificação dos níveis plasmáticos de insulina, glicose, e os valores  
2430 teciduais de GSH e TBARS, foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, e  
2431 as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ).

2432

### 2433 **3. Resultados**

2434

### 2435 *3.1 Níveis glicêmicos*

2436

2437 Antes da indução do diabetes os animais de todos os grupos experimentais não  
2438 apresentaram diferenças significativas nos níveis de glicose sanguínea, mostrando valores  
2439 abaixo de 120 mg/dL. Após a indução, todos os animais, com exceção os do grupo controle  
2440 (GC), apresentaram níveis sanguíneos de glicose acima de 300 mg/dL, diferindo  
2441 significativamente deste grupo, confirmando assim o quadro de diabetes. Após 10 e 20 dias de  
2442 tratamento com melatonina ou insulina evidenciou-se que o único grupo que apresentou o  
2443 nível de glicose semelhante ao grupo controle foi o administrado com insulina (GDI). No  
2444 entanto, o grupo GDMS apresentou valor hiperglicêmico significativamente menor que os  
2445 grupos GD e GDM (Tabela 1). Além disso, foi observado que no grupo GDMS os valores da  
2446 glicemia apresentaram numericamente uma tendência ao decaimento quanto maior foi o  
2447 tempo de administração de melatonina.

2448

### 2449 *3.2 Níveis plasmáticos de insulina*

2450

2451 A dosagem dos níveis plasmáticos do hormônio insulina revelou que antes da indução  
2452 ao diabetes pela estreptozotocina, todos os ratos apresentaram valores sem diferença  
2453 estatística em relação ao grupo controle (Fig 4A). Entretanto, as amostras de plasma coletadas  
2454 e analisados após 10 e 20 dias das respectivas administrações de melatonina ou insulina,  
2455 observou-se que apesar de um aumento significativo nos valores da insulina plasmática nos  
2456 animais do grupo administrado com melatonina a partir do dia de indução ao diabetes  
2457 (GDMS), apenas o grupo diabético tratado com insulina apresentou valores similares aos dos  
2458 animais do grupo controle, restaurando assim, seus níveis hormonais. (Figs. 4B e 4C).

2459

### 2460 *3.3 Estresse oxidativo pancreático*

2461

2462 A análise tecidual dos níveis de GSH nos grupos tratados com melatonina ou insulina  
2463 foram superiores aos animais do grupo GC e GD. (Fig. 5). Em relação às concentrações  
2464 teciduais dos níveis na peroxidação lipídica pancreática não foram encontradas diferenças  
2465 estatísticas entre os grupos experimentais (Fig. 6).

2466

### 2467 *3.4 Produção de ânions superóxido e atividade da NADPH oxidase na retina*

2468

2469 Em relação à produção basal de ânions superóxidos e a atividade da NADPH oxidase,  
2470 observou-se um aumento significativo dessas substâncias apenas no grupo diabético (GD) em  
2471 relação aos demais grupos experimentais (Figs. 7A e 7B).

2472

### 2473 *3.5 Análise histopatológica da retina*

2474

2475 Nas fotomicrografias são demonstradas as camadas da retina, tomando como referência  
2476 inicial a porção interna do lado esquerdo, adjacente ao corpo vítreo (CV). Assim, a análise  
2477 histopatológica de amostras de retina de ratos do grupo controle (Fig. 8A) revelou a presença  
2478 de estruturas bem preservadas como a membrana limitante interna (cabeça da seta), camada  
2479 de células ganglionares (g), camada plexiforme interna (pi), camada nuclear interna (ni),  
2480 células amácrinas (setas curtas), camada plexiforme externa (pe), camada nuclear externa  
2481 (ne), camada de bastonetes e cones (bc), epitélio pigmentar (setas tracejadas) e coróide (c).

2482 Após exposição à estreptozotocina foi observado que o grupo diabético (Fig. 8B) apresentava  
2483 desorganização da camada nuclear (ne) e plexiforme externa (pe) com presença de inúmeros  
2484 vacúolos (setas longas), deslocamento seroso da retina (dupla seta) e vasos sanguíneos  
2485 dilatados (asterisco) quadro típico de retinopatia diabética. Porém, após o tratamento com  
2486 insulina (Fig. 8C) e melatonina (Fig. 8D) induziu menor progressão da retinopatia diabética.  
2487 Verificou-se ainda, que no grupo tratado com melatonina simultaneamente (Fig. 8E) houve  
2488 melhor preservação da retina.

2489

### 2490 *3.6 Histoquímica com peroxidase de rábano*

2491

2492 Em relação à análise histoquímica com peroxidase de rábano, foi observado que em  
2493 todos os grupos experimentais de uma forma geral, os vasos apresentaram uniformização do  
2494 padrão vascular (Figs. 9A-E). Contudo, os vasos dos animais do grupo diabético GD e do  
2495 grupo tratado com insulina GDI apresentaram microaneurisma e tortuosidades caracterizando  
2496 assim o quadro de retinopatia diabética. Porém, nos animais que receberam melatonina,  
2497 observou-se na retina uma atenuação desses fatores (Figs 10A-E).

2498

### 2499 *3.7 Eletrorretinograma*

2500

2501 O exame de eletrorretinograma, em todas as suas formas (Escotópico, Fotópico, Misto e  
2502 Flicker), demonstrou haver diferença estatística apenas na amplitude da onda *a* do exame da  
2503 mista entre os grupos GC e GD (Figs. 11, 12, 13 e 14), mostrando assim uma possível perda  
2504 na quantidade de fotorreceptores no grupo diabético em relação ao grupo controle.

#### 2505 4. Discussão

2506           Nesse estudo, a análise histopatológica da retina juntamente com a histoquímica com  
2507 peroxidase de rábano mostraram mudanças vasculares típicas de retinopatia diabética como  
2508 tortuosidades e dilatação dos vasos sanguíneos, deslocamento e desorganização das camadas  
2509 retinianas, além de microaneurisma. No entanto, nos animais dos grupos GDM e GDMS a  
2510 administração suplementar de melatonina foi bem sucedida, pois reduziu as alterações  
2511 microvasculares. Isso pode ser devido porque a melatonina é capaz de cruzar membranas  
2512 biológicas (COSTA et al., 1995), e assim alcançar todos os compartimentos sub-celulares  
2513 protegendo-os dos radicais livres (MILLAN-PLANO et al., 2003). Evidenciando assim seu  
2514 caráter antioxidante e neuroprotetor (ACUNA-CASTROVIEJO et al., 2007). Além disso, é  
2515 sabido que lesões causadoras de hipóxia como o diabetes, ocasionam angiogênese e  
2516 impulsionam a produção do VEGF (ANDERSON et al., 2010). Esses neovasos apresentam  
2517 constituição anatômica alterada levando a sangramento, exsudação e reação inflamatória  
2518 (GUIMARÃES; GERENUTTI 2013). No entanto, Alvarez-García et al., (2013) relataram que  
2519 a melatonina tem influência sobre a produção do VEGF, reduzindo a angiogênese e atuando  
2520 sobre a ciclooxigenase 2 (COX-2) modulando a inflamação e inibindo a proliferação celular  
2521 (WANG et al., 2012). Assim, a diminuição da secreção do (VEGF) pela melatonina pode ter  
2522 sido o principal motivo da diminuição da deformidade vascular.

2523           Em relação aos valores hiperglicêmicos, estudos têm demonstrado que a administração  
2524 da melatonina não reduz os valores hiperglicêmicos na condição de diabetes (CAM et al.,  
2525 2003; GUVEN et al., 2006). Por outro lado, relatos apontaram que a administração desse  
2526 hormônio previamente a indução do diabetes experimental resulta em níveis hiperglicêmicos  
2527 menores, indicando que a melatonina exerça uma tendência a diminuição da glicemia em  
2528 ratos (PANDI-PERUMAL et al., 2008). Esses dados corroboram os nossos achados, pois a

2529 melatonina administrada simultaneamente à indução do diabetes pela estreptozotocina  
2530 provocou tênue redução da glicemia nesses animais. Ademais, foi observado que quanto  
2531 maior foi o tempo de administração de melatonina, menor foi à média da glicemia,  
2532 evidenciando o efeito protetor deste hormônio. Assim, a melatonina atuou contribuindo para a  
2533 homeostase da glicose, seja diminuindo a neoglicogênese, seja revertendo a resistência à  
2534 insulina aumentando a captação de glicose em adipócitos e músculos esqueléticos (SHIMA et  
2535 al., 1997).

2536 A análise da insulina plasmática revelou que só o grupo tratado com insulina restaurou  
2537 os níveis desse hormônio semelhantemente ao grupo controle, no entanto, houve um aumento  
2538 significativo da insulina quando administrado a partir do primeiro dia de indução do diabetes  
2539 grupo (GDMS). Sabe-se que a glândula pineal apresenta receptores para diferentes  
2540 hormônios, como por exemplo, a insulina, desta forma, a produção de melatonina sofre  
2541 influência deste hormônio e vice-versa (CIPOLLA-NETO; AFECHÉ 2008). Além da  
2542 influência na produção de insulina ela aumenta a sensibilidade dos tecidos periféricos e do  
2543 sistema nervoso à insulina por promover ativação dos seus receptores (PICIANATO et al.,  
2544 2004) e por aumentar a síntese de transportadores de glicose como a GLUT 4 (SERAPHIM  
2545 et al., 1997). Além disso, Yavuz et al. (2003) demonstraram que a melatonina evitou danos  
2546 oxidativos causados pela estreptozotocina no pâncreas de ratos, protegendo desta forma as  
2547 células beta. Isso, também pode ter contribuído para um possível efeito protetor deste  
2548 hormônio quando aplicada simultaneamente sobre as células  $\beta$  pancreáticas dos ratos, que  
2549 ainda apresentaram capacidade secretora de insulina.

2550 Defesas antioxidantes encontram-se amplamente distribuídos no organismo e  
2551 compreendem agentes que removem radicais livres, as proteínas que minimizam a  
2552 disponibilidade de pró-oxidantes e os agentes de baixo peso molecular que aprisionam

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

2555 Estudos prévios relataram que no diabetes os níveis de glutatona 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 glutatona, 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- $\alpha$ ), 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 uveíte 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, conseqüentemente  
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).

2600 Sabe-se que a exposição da vasculatura à hiperglicemia e o aumento de ácidos graxos  
2601 livres característicos do diabetes mellitus induzem à produção de superóxidos e que isto pode  
2602 ser inibido por tratamento com antioxidantes em algumas situações (SCHAAN; SILVA;  
2603 IRIGOYEN 2010). Esses dados também corroboram com os nossos resultados em que o  
2604 grupo diabético apresentou um aumento desses ânions em relação ao grupo controle e uma  
2605 diminuição nos grupos tratados com melatonina e insulina

2606 O eletrorretinograma é um dos meios de avaliação da função da retina no animal vivo,  
2607 principalmente na indicação de pacientes ao tratamento cirúrgico, da catarata e na  
2608 diferenciação de doenças da retina (MARMOR et al., 2009).

2609 Sakai et al. (1995) evidenciaram que as amplitudes e as latências dos picos das onda *a*  
2610 e *b* em ratos diabéticos pela estreptozotocina durante 6 semanas não diferiram  
2611 significativamente daqueles nos ratos controle. No entanto, Gualtieri (2004) encontrou  
2612 alterado alguns componentes do eletrorretinograma de campo total em pacientes com diabetes  
2613 tipo 2, como a diminuição da amplitude da onda *b* e dos potenciais oscilatórios além do  
2614 aumento da latência. Esses achados corroboram em parte com nosso estudo o qual mostrou  
2615 haver diferença estatística apenas na amplitude da onda *a* do exame da mista entre os grupos  
2616 controle GC e o diabético GD. Mostrando assim uma perda na quantidade de fotorreceptores  
2617 no grupo diabético. Desta forma podemos concluir que apesar dos trabalhos não apresentarem  
2618 um padrão de resposta, em nosso estudo os grupos tratados com melatonina não diferiram em  
2619 relação ao controle, o que pode ter sido devido as suas propriedades defensoras, várias linhas  
2620 de pesquisa sugerem que a melatonina pode agir como um agente protetor em doenças  
2621 oculares como catarata, glaucoma, retinopatias e injúrias isquêmicas (SIU et al., 2006). Além  
2622 de seus efeitos antioxidantes, vários outros mecanismos estão envolvidos na neuroproteção,  
2623 incluindo a diminuição no nível do fator de crescimento endotelial vascular (KAUR et al.,

2624 2007) e da concentração sináptica de glutamato na retina (SÁENZ et al., 2004), bloqueio  
2625 intracelular do aumento dos níveis de cálcio (PAPPOLLA et al., 1997) entre outros.  
2626 Facilitando desta forma a atividade elétrica da retina.

2627         Diante dos resultados, pode-se concluir que as retinas dos animais diabéticos estão  
2628 mais vulneráveis aos danos decorrentes do quadro de diabetes e que a melatonina foi eficaz no  
2629 seu tratamento, principalmente quando ela foi administrada simultaneamente à indução do  
2630 diabetes, pois ela atuou preventivamente diminuindo a glicemia e preservando e melhorando  
2631 as células da retina, além disso, ela agiu indiretamente, estimulando a produção de glutathione  
2632 e insulina e diminuindo a produção de ânions superóxidos. No entanto, nesta pesquisa a  
2633 melatonina não atuou na atividade elétrica. Assim, concluímos que a melatonina pode ser um  
2634 importante agente terapêutico no tratamento coadjuvante da retinopatia diabética, devido a  
2635 sua ação neuroprotetora.

2636

2637

2638

2639

2640

2641

2642

2643

2644

2645 **5. Referências**

2646

2647 Acuna-Castroviejo, D.; Escames, G.; Rodriguez, M. I.; Lopez, L. C. Melatonin role in the  
2648 mitochondrial function. *Front. Biosci*, v. 12, p. 947-963, 2007.

2649 Al-Shabrawey, M.; Bartoli, M.; El-Remessy, A. B.; Ma, G.; Matragoon, S.; Lemtalsi, T.;  
2650 Caldwell, R. W.; Caldwell, R. B. Role of NADPH Oxidase and Stat3 in statinmediated  
2651 protection against diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, v. 49, p. 3231–3238,  
2652 2008.

2653 Alvarez-García, V.; González, A.; Alonso-González, C.; Martínezcampa, C.; Cos, S.  
2654 Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. *J.*  
2655 *Pineal. Res*, v. 54, n. 4, p. 373-380, 2013.

2656 Alves, A. P.; Santos, R. W. V.; Sobrinho, E. F. A.; Rocha, S. P. L.; Loch, A. C. N.  
2657 Retinopatia em pacientes hipertensos e/ou diabéticos em uma unidade de saúde da família.  
2658 *Rev. Bras. Oftalmol*, v.73, n. 2, p. 108-111, 2014.

2659 Anderson, O. A.; Bainbridg, J. W. B.; Shima, D. T. Delivery of anti-angiogenic molecular  
2660 therapies for retinal disease. *Drug. Discov. Today*, v. 15, n. 7-8, p. 272-82, 2010.

2661 Anwar, M. M.; Meki, A. R. M. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats:  
2662 effects of garlic oil and melatonin. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol*, v. 135,  
2663 p. 539–547, 2003.

2664 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 control of arterial pressure and heart rate 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 Guimarães, 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.; Anhô, 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-Espiarde, 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.; Zabrodskaya, S. V.; kubyshin, V. L.; Lapshina, E. A.;  
2807 Bryszewska, M.; Reiter, R. J.; Zavodnik, I. B. Melatonin attenuates metabolic disorders due  
2808 to streptozotocin-induced 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

2846 **Tabela 1.** Média  $\pm$  desvio-padrão dos níveis de plasmáticos de glicose (mg/dL). GC- grupo  
 2847 controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético tratado com melatonina; GDMS –  
 2848 grupo diabético tratado com melatonina simultaneamente; GDI – grupo diabético tratado com  
 2849 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

2850

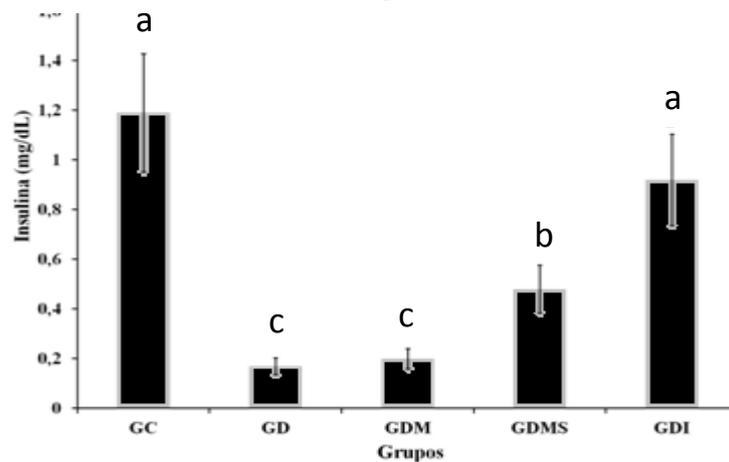
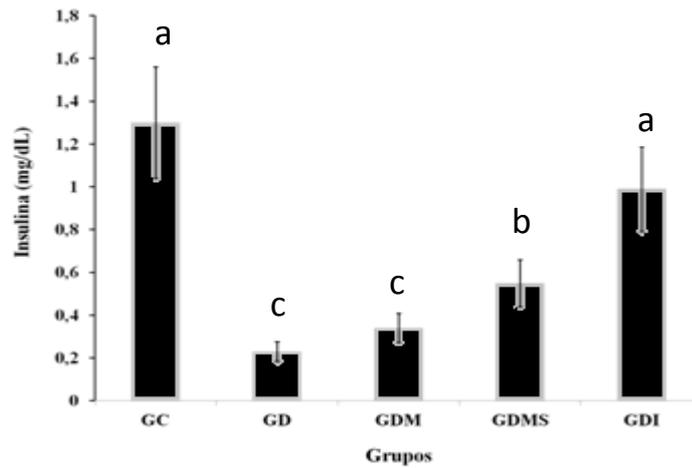
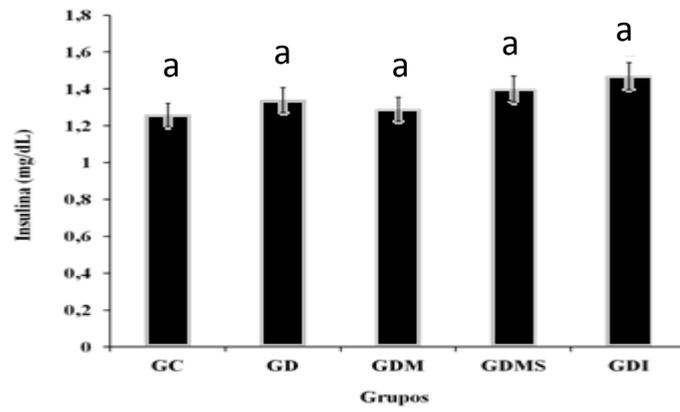
2851 Médias seguidas das mesmas letras minúsculas entre os grupos e maiúsculas ao longo do  
 2852 tratamento não diferem entre si de acordo com o teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn  
 2853 ( $p < 0,05$ ). Coluna: grupos experimentais e Linhas: tratamentos

2854

2855

2856

2857



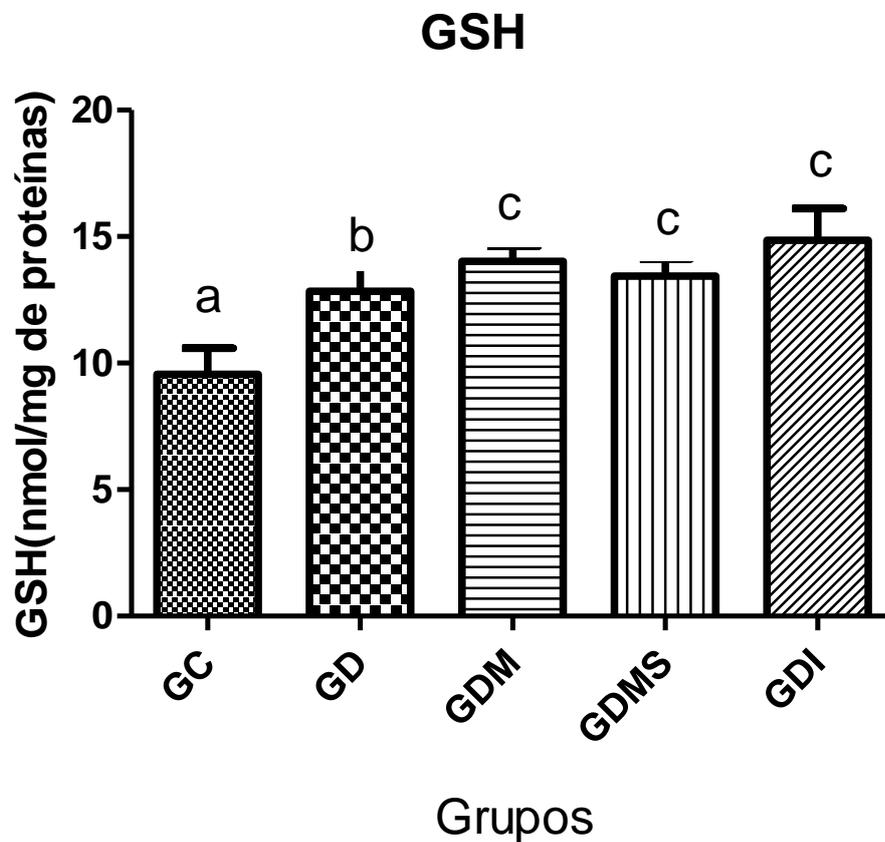
**A**

**B**

**C**

**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 ( $p < 0,05$ ).

2885  
2886  
2887  
2888  
2889  
2890  
2891  
2892  
2893  
2894  
2895  
2896  
2897  
2898  
2899  
2900  
2901  
2902  
2903  
2904  
2905  
2906  
2907  
2908  
2909  
2910



**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 ( $p < 0,05$ ).

2911

2912

2913

2914

2915

2916

2917

2918

2919

2920

2921

2922

2923

2924

2925

2926

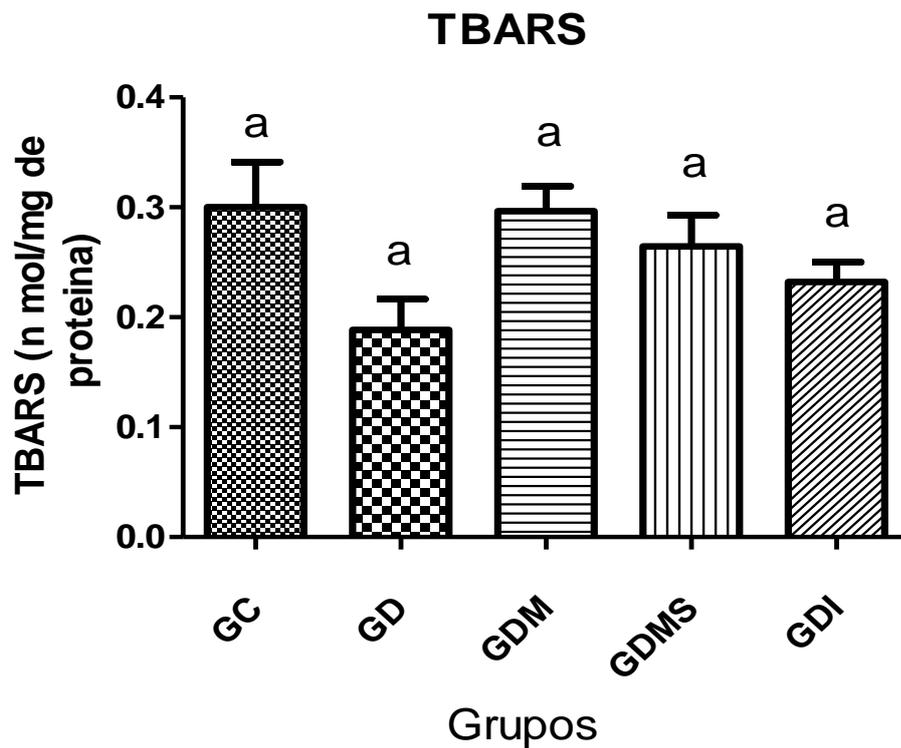
2927

2928

2929

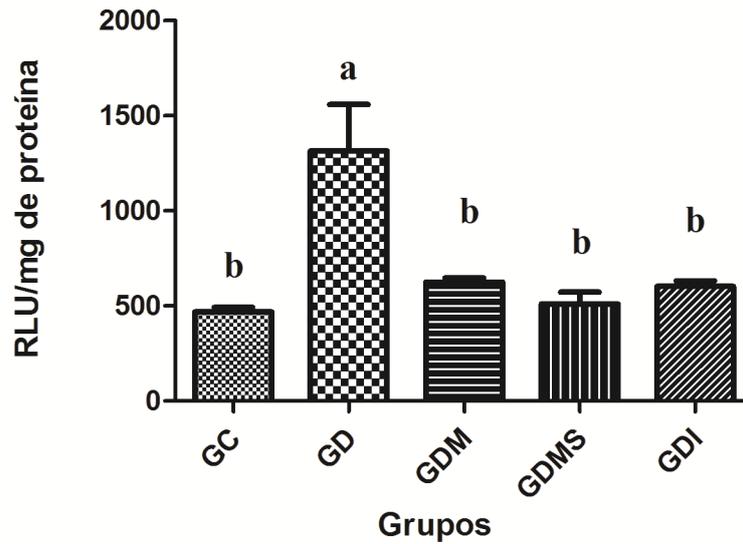
2930

2931



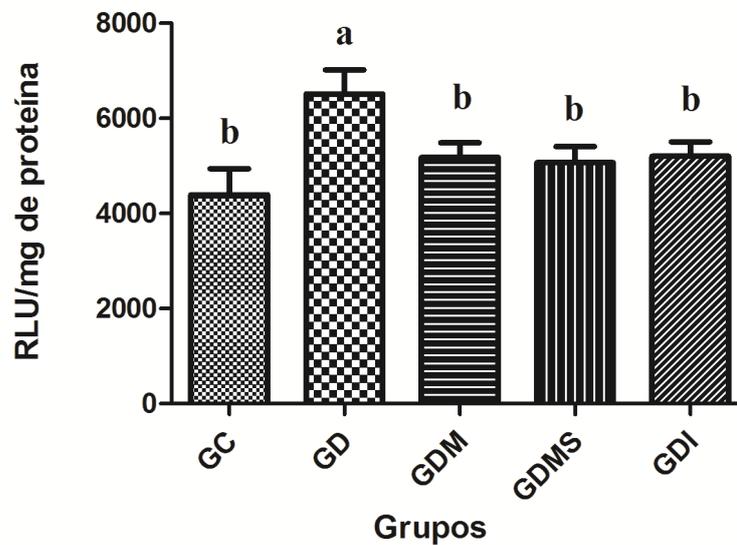
**Figura 6.** Gráfico dos valores de TBARS no pâncreas dos animais nos diferentes grupos experimentais (nmol/mg de proteína). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina. \*Médias seguidas pela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

### Superóxido basal



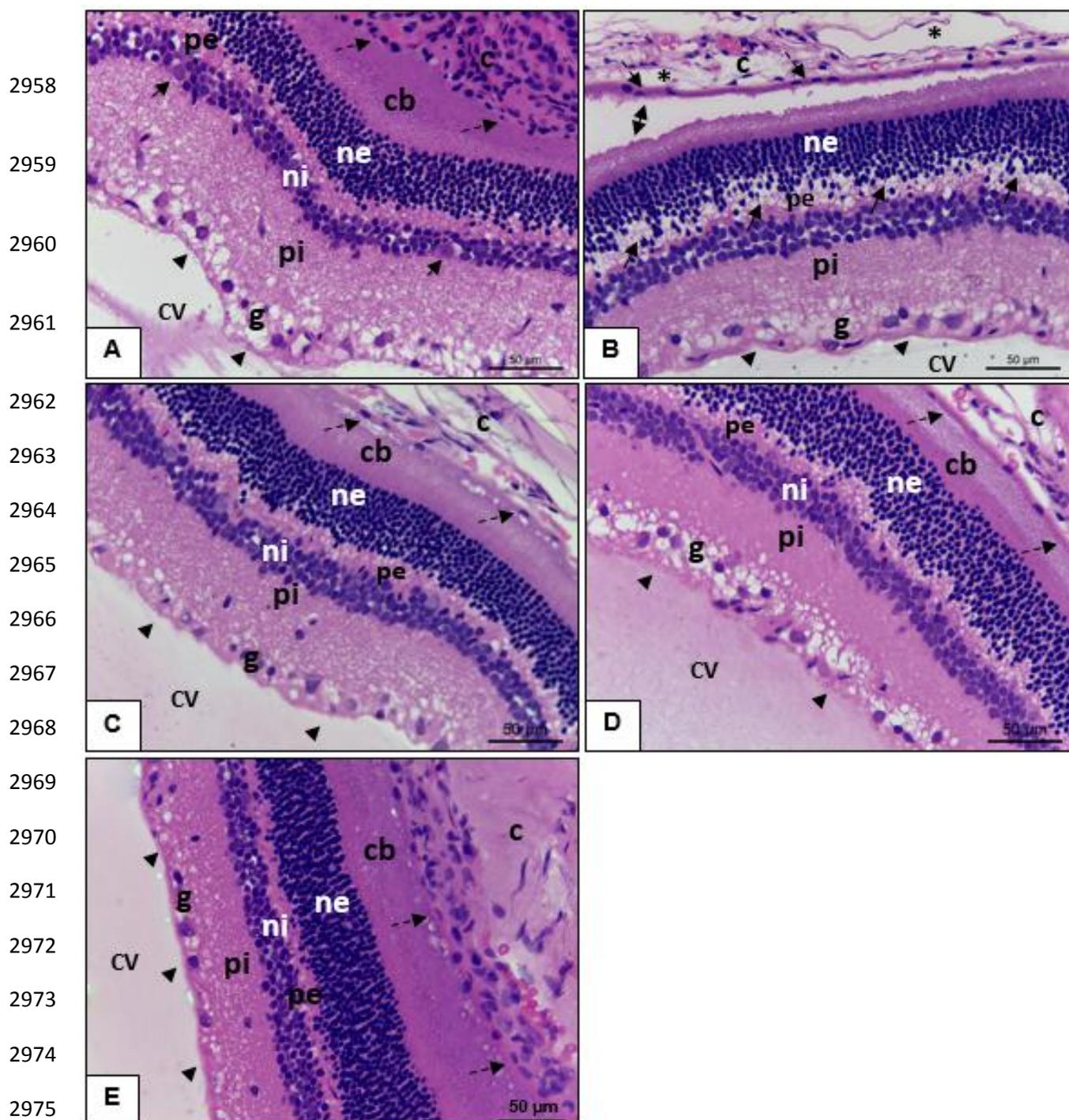
A

### Atividade da NADPH oxidase



B

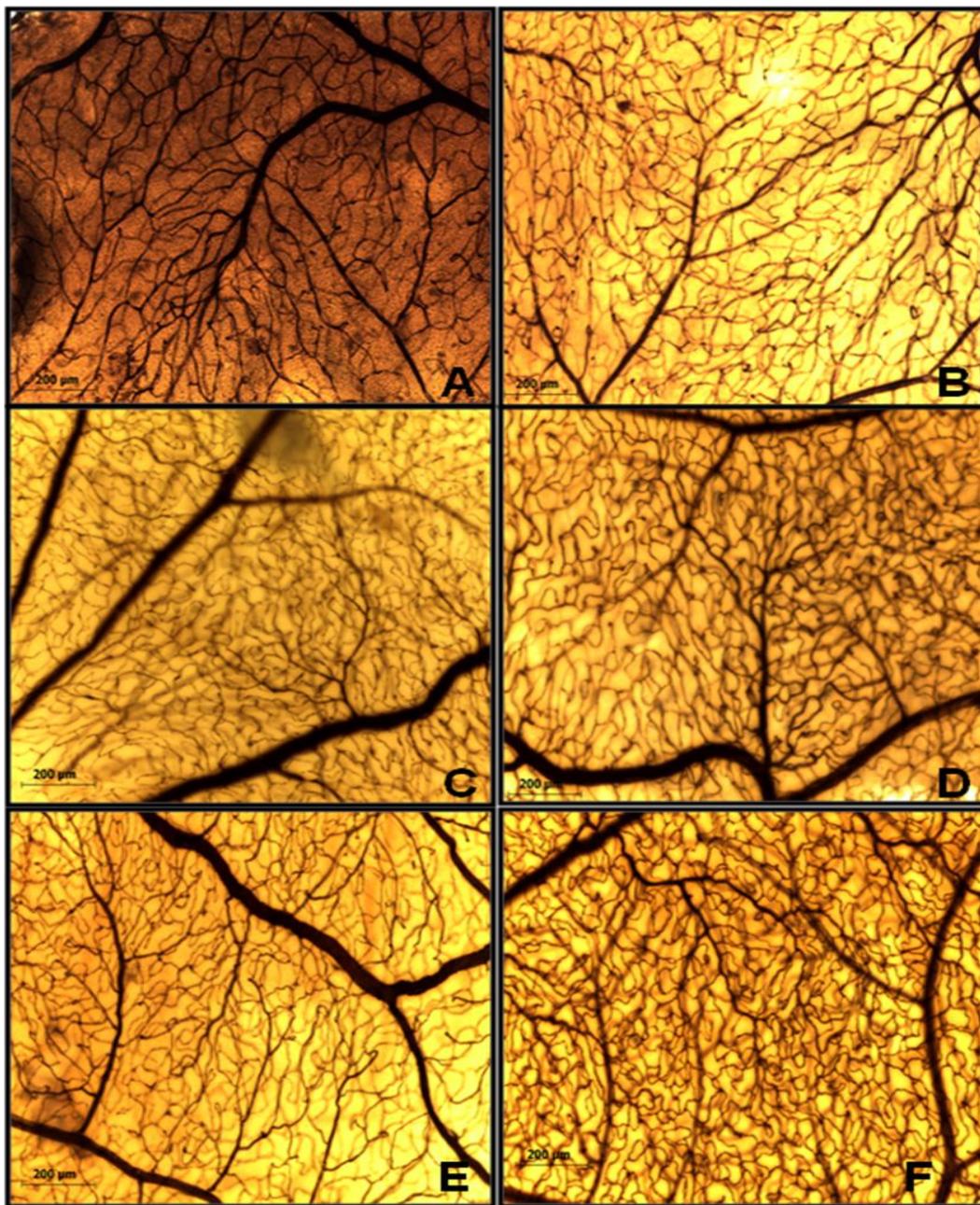
**Figura7:** Gráfico dos valores de Superóxido basal (A) e Atividade da NADPH oxidase na retina dos animais nos diferentes grupos experimentais (RLU/mg de proteína). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético tratado com melatonina; GDMS – grupo diabético tratado com melatonina simultaneamente; 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 ( $p < 0,05$ )



2976 **Figura 8:** Nas fotomicrografias são demonstradas as camadas da retina, tomando como referência inicial a  
 2977 porção interna do lado esquerda, adjacente ao corpo vítreo (CV). Assim, a análise histopatológica de  
 2978 amostras de retina de ratos do grupo controle (Fig. A) revelou a presença de estruturas bem preservadas  
 2979 como a membrana limitante interna (cabeça de seta), camada de células ganglionares (g), células amácrinas  
 2980 (setas curtas), camada plexiforme interna (pi), nuclear interna (ni), camada plexiforme externa (pe),  
 2981 camada nuclear externa (ne), camada de bastonetes e cones (bc), epitélio pigmentar (setas tracejadas) e  
 2982 coroide (c). Após exposição à estreptozotocina GD (Fig. B) observou-se desorganização da camada nuclear  
 2983 externa (ne) e plexiforme externa (pe), com presença de inúmeros vacúolos (setas longas), deslocamento  
 2984 seroso da retina (dupla seta) e vasos sanguíneos dilatados (asterisco) quadro típico de retinopatia diabética.  
 2985 Porém, após o tratamento com insulina (Fig. C) e melatonina (Fig. D) observou-se menor progressão da  
 2986 retinopatia diabética. Verificou-se, ainda, que no grupo tratado com melatonina simultaneamente (Fig. E)  
 2987 houve melhor preservação da retina.

2988

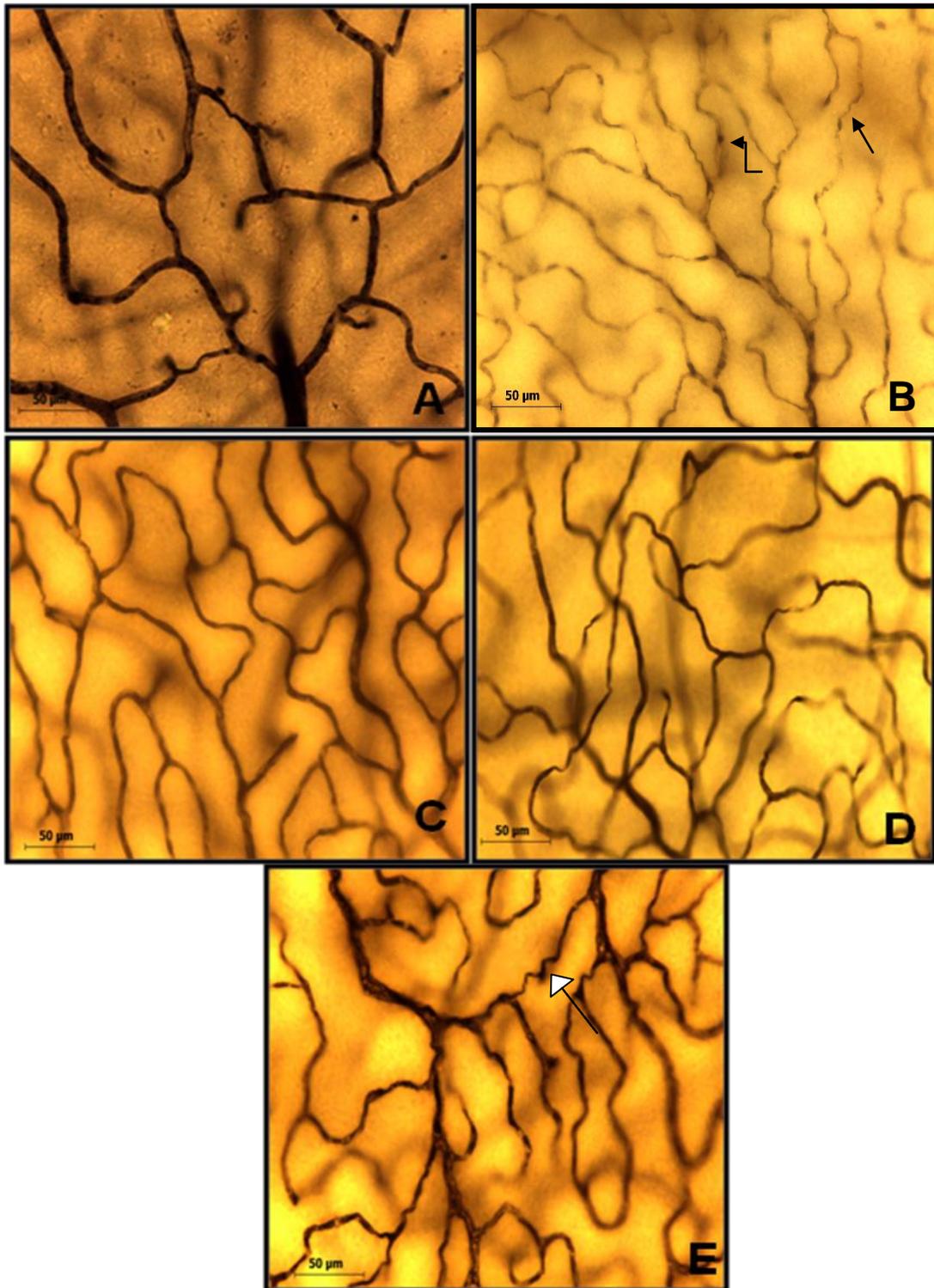
2989  
2990  
2991  
2992  
2993  
2994  
2995  
2996  
2997  
2998  
2999  
3000  
3001  
3002  
3003  
3004  
3005  
3006  
3007  
3008



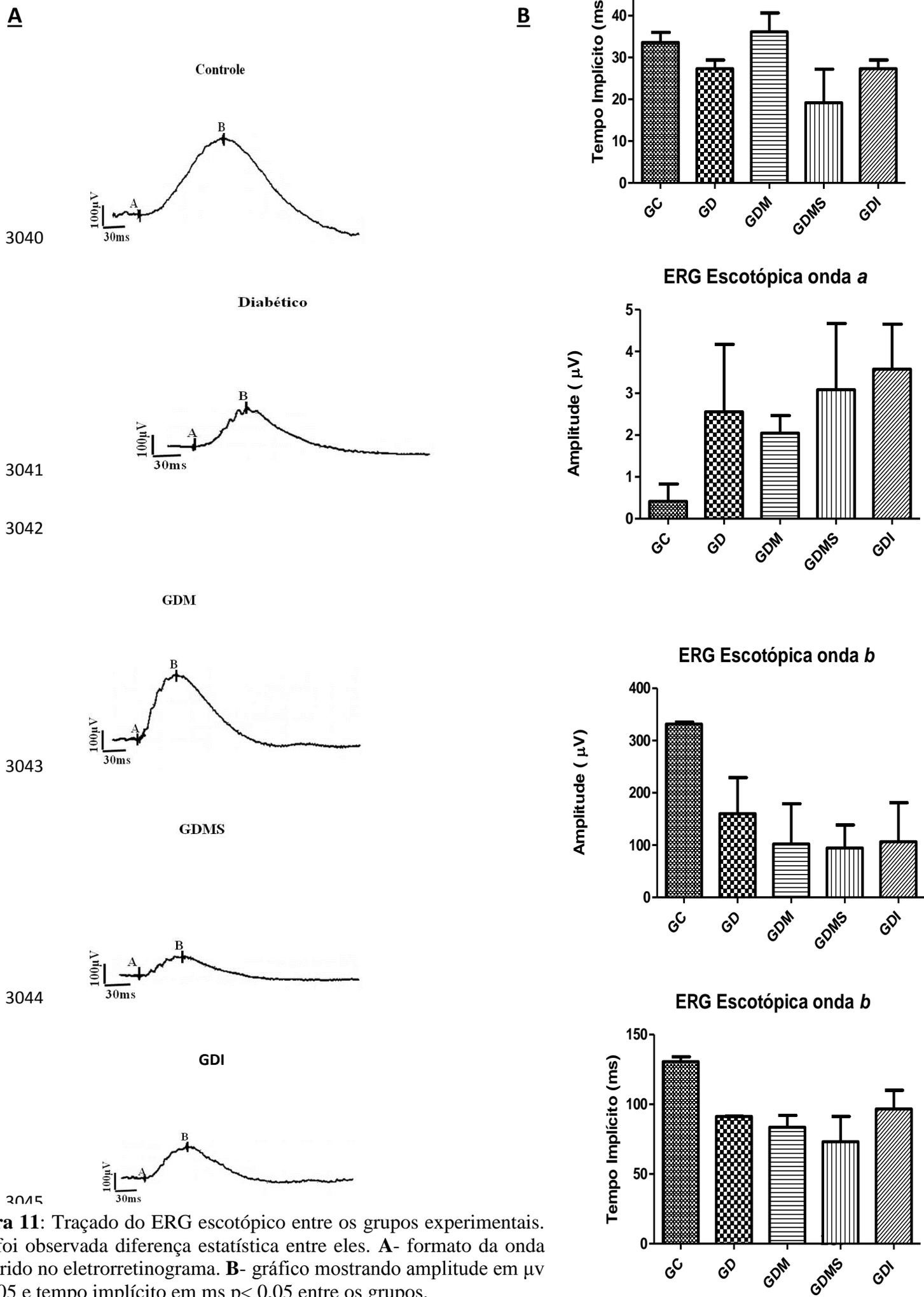
3009 **Figura 9:** Fotomicrografia dos vasos da retina dos grupos experimentais. Observar  
3010 uniformização do padrão vascular entre os grupos experimentais. Figura A e B (grupo  
3011 controle), Figura C (grupo diabético), Figura D (grupo diabético tratado com melatonina) e  
3012 Figura E (grupo diabético tratado com melatonina simultaneamente) e Figura F (grupo  
3013 diabético tratado com insulina).

3014

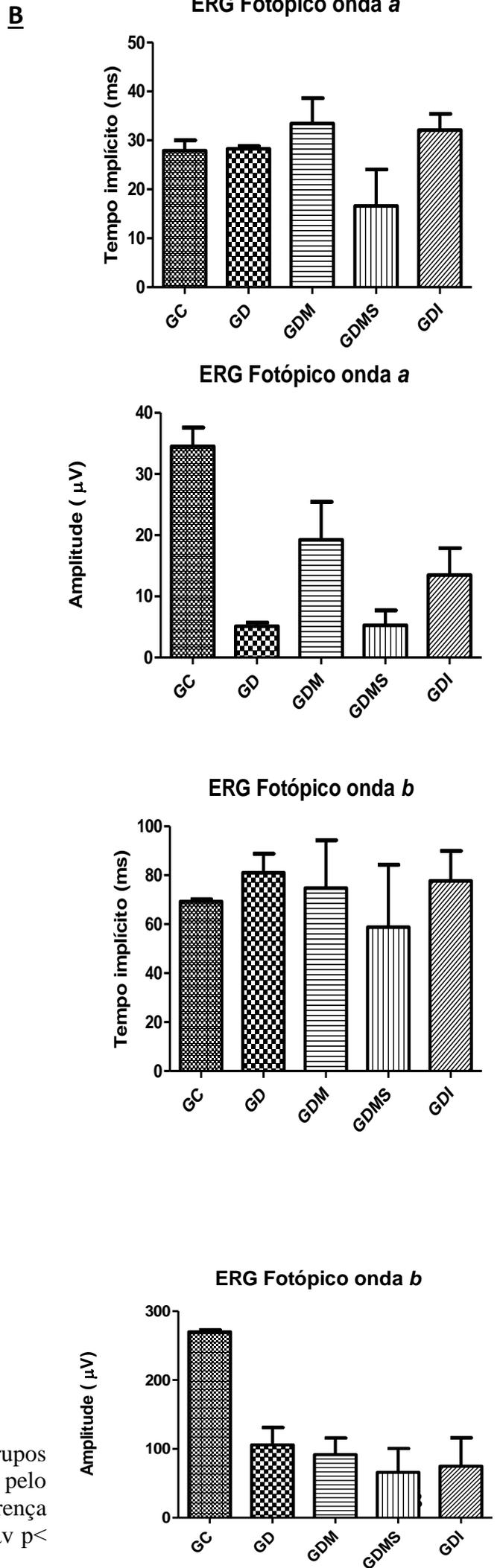
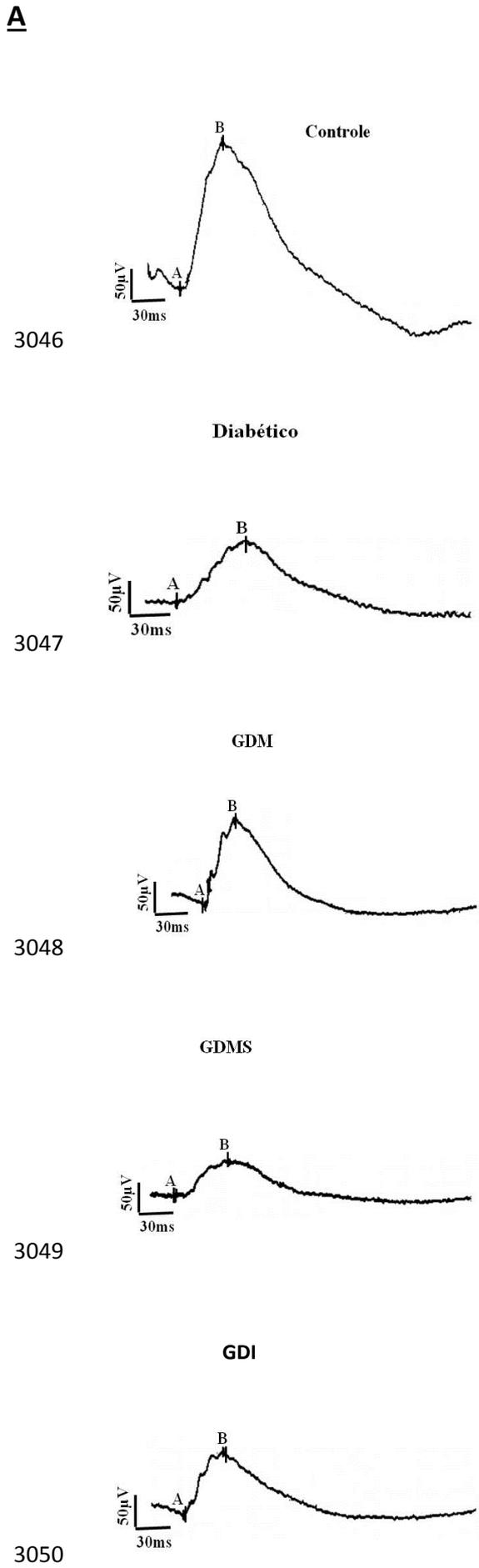
3015  
3016  
3017  
3018  
3019  
3020  
3021  
3022  
3023  
3024  
3025  
3026  
3027  
3028  
3029  
3030  
3031  
3032  
3033  
3034  
3035



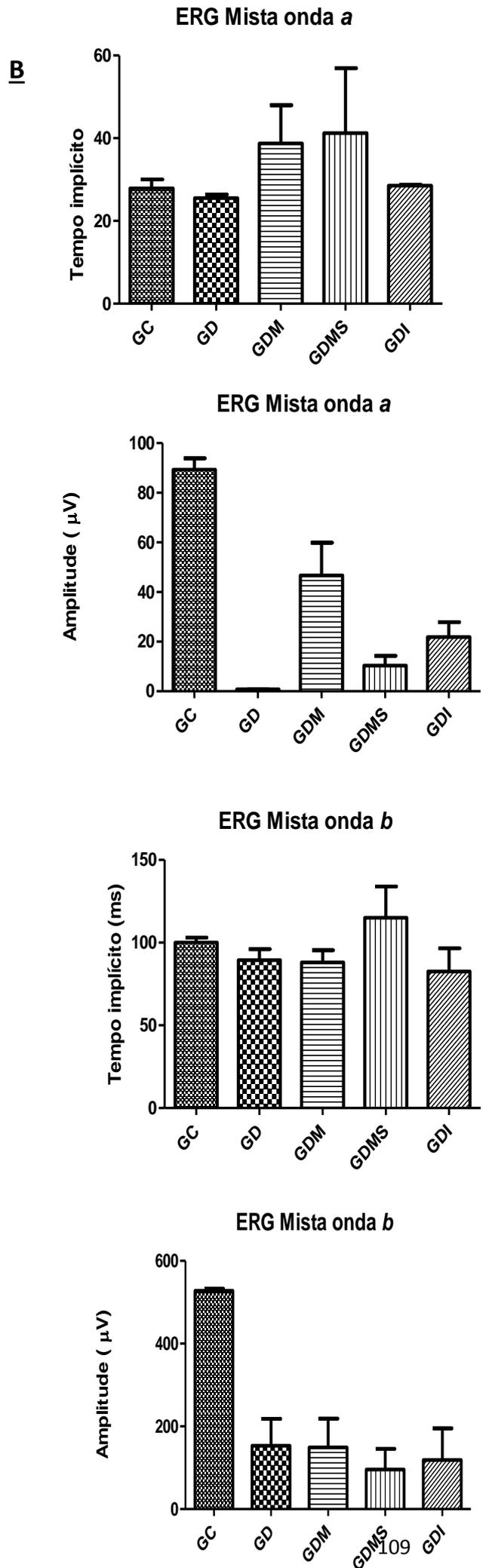
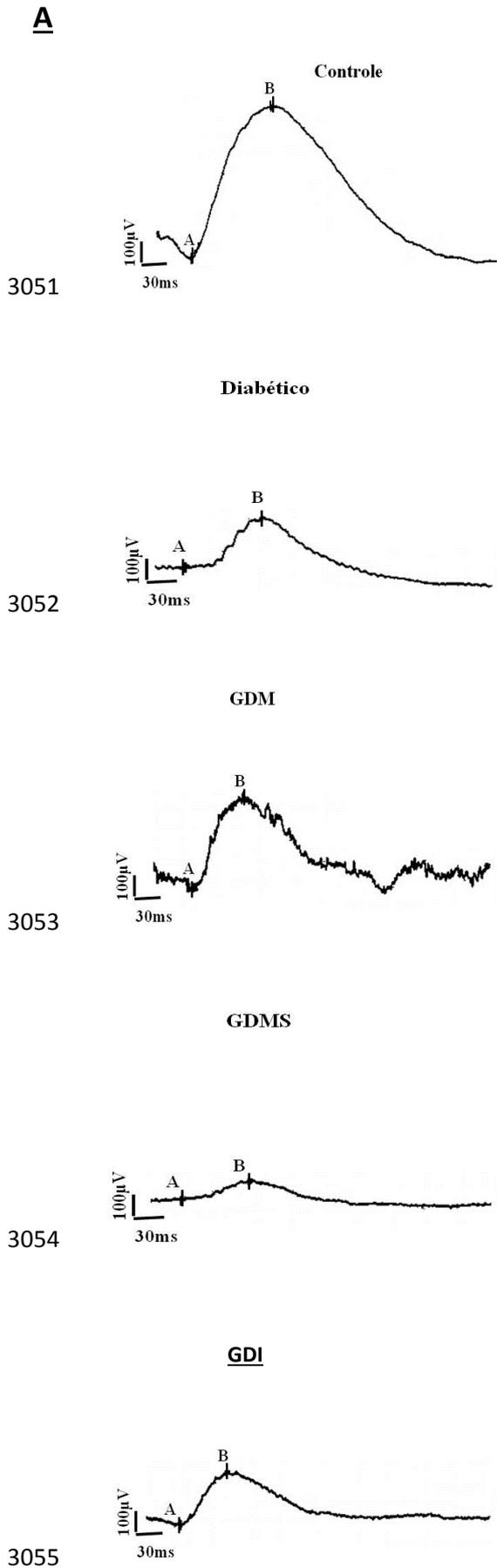
3036 **Figura 10:** Fotomicrografia dos vasos da retina dos grupos experimentais. Observar presença de  
3037 microaneurismas (seta preta) e tortuosidades (seta com cabeça branca) nos vasos da retina do grupo  
3038 diabético Figura B e do grupo insulina Figura E. Observar atenuação desses fatores no grupo tratado  
3039 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 adquirida no eletrorretinograma. **B-** gráfico mostrando amplitude em µV  $p < 0,05$  e tempo implícito em ms  $p < 0,05$  entre os grupos.



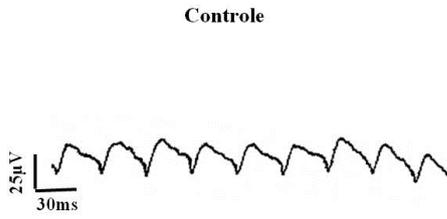
**Figura 12:** Traçado do ERG fotópico entre os grupos experimentais. **A-** formato das ondas adquiridas pelo eletrorretinograma dos grupos. Não foi observada diferença estatística entre eles. **B-** gráfico mostrando amplitude em  $\mu\text{V}$   $p < 0,05$  e tempo implícito em ms  $p < 0,05$  entre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



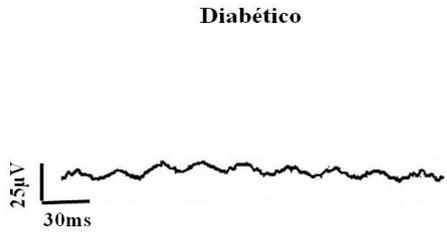
**Figura 13:** Traçado do ERG escotópico misto dos grupos experimentais. **A-** formato da onda adquirido no eletrorretinograma. Foi observada diferença estatística na amplitude da onda *a* entre o GC e o GD. **B-** gráfico mostrando amplitude em  $\mu\text{V}$   $p < 0,05$  e tempo implícito em ms 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

3056

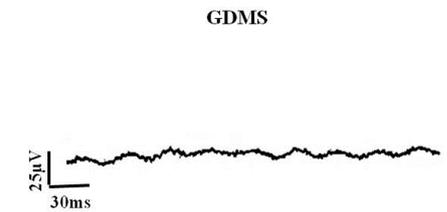
**A**



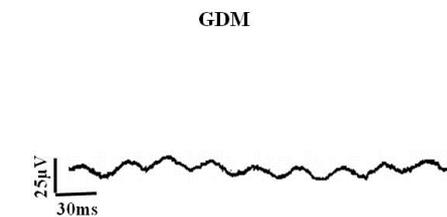
3058



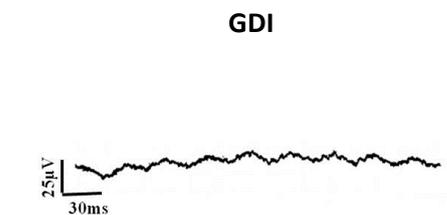
3059



3060

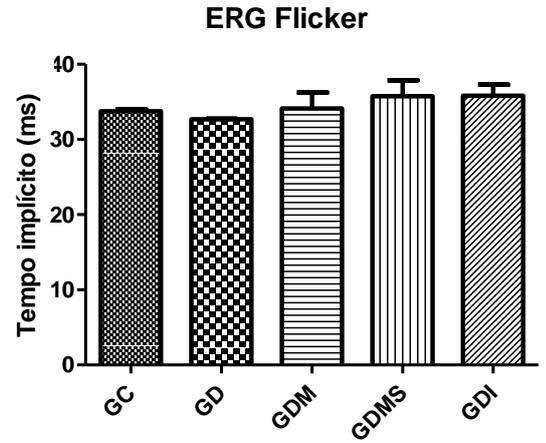


3061

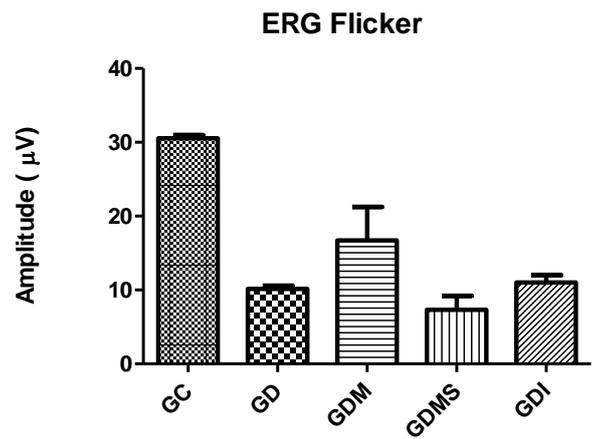


3062

**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

3063

3064

3065

3066 Melatonina regula expressão de citocinas inflamatórias, VEGF e apoptose em ratos com  
3067 retinopatia diabética

3068

3069

3070 Ismaela Maria Ferreira de Melo<sup>1</sup>, Cíntia Giselle Martins Ferreira<sup>1</sup>, Solange Bezerra da Silva<sup>1</sup>,

3071 Lecio Leone Almeida<sup>1</sup>, Fabrício Bezerra de Sá<sup>1</sup>, Valéria Wanderley Teixeira<sup>1</sup>, Álvaro Aguiar

3072 Coelho Teixeira<sup>1\*</sup>

3073

3074

3075 <sup>1</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia

3076 Animal, Recife, Brasil

3077

3078

3079

3080

3081 \*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois

3082 Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

3083 E-mail: teixeira.alvaro@outlook.com (TEIXEIRA, A.A.C.)

3084 **Resumo:** A presente pesquisa analisou se a melatonina seria capaz de mediar à expressão de  
3085 VEGF, IL-6 e TNF- $\alpha$ , além do índice apoptótico em ratos com retinopatia diabética. Utilizou-  
3086 se 50 ratos albinos da linhagem Wistar, divididos nos seguintes grupos: **GC:** ratos sem  
3087 indução ao diabetes pela estreptozotocina; **GD:** ratos induzidos ao diabetes pela  
3088 estreptozotocina e tratados com placebo; **GDM:** ratos induzidos ao diabetes pela  
3089 estreptozotocina e após confirmação do diabetes tratados com melatonina na dosagem de  
3090 10mg/kg de peso corporal durante 20 dias; **GDMs:** ratos induzidos ao diabetes pela  
3091 estreptozotocina e simultaneamente tratados com melatonina na dosagem de 10mg/kg durante  
3092 20 dias; **GDI:** ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e após confirmação do  
3093 diabetes tratados com insulina durante 20 dias. O diabetes foi induzido pela administração  
3094 intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg), e a insulina (5 U/dia) foi administrada via  
3095 subcutânea. Para apoptose foi utilizado TUNEL e para a análise imunohistoquímica foram  
3096 utilizados anticorpos da Santa Cruz Biotechnology. Os resultados mostraram que os grupos  
3097 que foram tratados com melatonina e principalmente aqueles que receberam esse hormônio  
3098 simultaneamente diminuiram a expressão das citocinas e do VEGF, além da apoptose. Assim,  
3099 conclui-se que a melatonina pode regular a expressão desses fatores melhorando a condição  
3100 da retina na retinopatia diabética.

3101

3102

3103

3104

3105

3106

3107

3108

3109 **Palavras-chave:** Apoptose, citocinas, melatonina, ratos, retinopatia diabética

3110

3111

3112

3113

3114 **Abstract:** This study examined whether melatonin would be able to mediate the expression of  
3115 VEGF, IL-6 and TNF- $\alpha$ , in addition to the apoptotic index in rats with diabetic retinopathy.  
3116 We used 50 albino Wistar rats were divided into the following groups: GC: no induction mice  
3117 diabetes by streptozotocin; GD: rats induced by streptozotocin diabetes and treated with  
3118 placebo; GDM: rats by streptozotocin induced diabetes mellitus and after confirmation treated  
3119 with melatonin at a dose of 10mg / kg body weight for 20 days; GDMS: mice induced by  
3120 streptozotocine diabetes and simultaneously treated with melatonin at a dose of 10mg / kg for  
3121 20 days; GDI: rats by streptozotocin induced diabetes mellitus and after confirmation treated  
3122 with insulin for 20 days. Diabetes was induced by intraperitoneal administration of  
3123 streptozotocin (60 mg / kg) and insulin (5 U / day) was administered subcutaneously. For  
3124 apoptosis was used TUNEL and immunohistochemistry were used antibodies from Santa  
3125 Cruz Biotechnology. The results showed that the groups treated with melatonin, and  
3126 especially those receiving hormone that both decreased expression of VEGF and cytokines, as  
3127 well as apoptosis. Thus, it is concluded that melatonin can regulate the expression of these  
3128 factors improving retinal condition in diabetic retinopathy.

3129

3130

3131

3132

3133

3134 **Keywords:** apoptosis, cytokines, melatonin, mice, diabetic retinopathy

3135

3136

3137

3138

3139

3140

3141

3142

## 3143 **1. Introdução**

3144

3145 Sabe-se que no diabetes, os níveis de citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas no  
3146 vítreo e na retina (KOWLURU; ODENBACH 2004) e que a regulação positiva de vários  
3147 fatores, tanto angiogênicos quanto inflamatórios, tem sido relacionados com a patogênese da  
3148 retinopatia diabética (RD) (AIELLO 2005).

3149 Os processos fisiológicos de reparo que auxiliam as células retinianas a sobreviverem ao  
3150 estresse incluem a liberação aumentada de diversos fatores de crescimento e citocinas,  
3151 incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), IGF-1, interleucinas-1 e fator de  
3152 necrose tumoral (TNF) (SERRARBASSA; DIAS; VIEIRA, 2008). Estas proteínas que têm  
3153 sido implicadas no desenvolvimento da RD, também provêm funções neurotróficas para  
3154 apoiar a sobrevivência das células da retina (GARIANO; GARDNER, 2005). O aumento da  
3155 liberação de citocinas pode servir como uma função adaptativa para manter a função neuronal  
3156 mas, ao mesmo tempo se a liberação for exagerada, causa dano vascular progressivo  
3157 resultando em edema de mácula e neovascularização (GARIANO; GARDNER, 2005). Assim,  
3158 este ciclo vicioso perpetua tanto o dano vascular como o neural e culmina nas características  
3159 clínicas da RD (ANTONETTI et al., 2006).

3160 O Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um composto que, sob condições  
3161 de hipóxia ou de isquemia estimula o aumento da vasculatura, ele desempenha um papel  
3162 central no aumento da permeabilidade vascular e angiogênese, enquanto que os fatores  
3163 inflamatórios, como as interleucinas, o fator de necrose tumoral (TNF), e as angiopoietinas  
3164 (Ang-2), têm sido relacionados com as vias fisiopatológicas que conduz a retinopatia  
3165 diabética proliferativa (RANGASAMY; McGUIRE; DAS 2012).

3166 Noma et al. (2002) explanaram que pacientes com diabetes mellitus e retinopatia  
3167 diabética apresentaram maiores níveis de VEGF no humor aquoso e vítreo comparado com o  
3168 do plasma, o que está relacionado com a atividade desta enfermidade. Além disso, pesquisas  
3169 mostraram maior ativação leucocitária na retina de ratos diabéticos (MOTTA; COBLENTZ;  
3170 MELO 2008).

3171 Estudos também têm demonstrado significante aumento nas concentrações de IL-6 e  
3172 TNF- $\alpha$  em pacientes com retinopatia diabética progressiva. Estas observações confirmam a  
3173 natureza inflamatória e imunológica da fisiopatologia dessa enfermidade (GOLOGORSKY;  
3174 THANOS; VAVVAS, 2012).

3175 Diversos estudos sugerem que o diabetes causa uma perda crônica de neurônios na  
3176 retina pelo aumento da frequência de apoptose (KERRIGAN et al., 1997; MIZUTANI;  
3177 KERN; LORENZI 1996). Portanto, o aumento da apoptose na retina é um componente da  
3178 retinopatia diabética (SERRARBASSA; DIAS; VIEIRA 2008). O Mecanismo pelo qual o  
3179 estresse oxidativo pode aumentar a apoptose parece ser complexo, mas poderia envolver o  
3180 aumento da peroxidação lipídica na membrana, injúria oxidativa de macromoléculas  
3181 essenciais para a função celular e alterações no sinal de transdução e expressão gênica  
3182 (MATSURA et al., 1999).

3183 A avaliação das relações entre diabetes, metabolismo da glicose, e os efeitos da  
3184 melatonina é um tema de grande interesse (DERLACZ et al., 2005). Foi sugerido que  
3185 tratamentos com antioxidantes podem ser uma importante opção terapêutica na prevenção das  
3186 complicações vasculares causadas pelo diabetes (BONJUGA et al., 2004). A proteção  
3187 antioxidante da melatonina já foi demonstrada tanto *in vivo* como *in vitro* ao nível de  
3188 membrana celular, mitocôndrias e núcleo (REITER, 2000). Além de suas ações como um  
3189 eliminador de radicais livres, ela também estimula enzimas antioxidantes, como por exemplo

3190 a superóxido dismutase a glutational peroxidase e a glutational redutase, o que promove ainda  
3191 mais a sua capacidade de reduzir a toxicidade dos radicais livres e dos seus reagentes  
3192 associados (REITER et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2004). Pesquisas mostraram que  
3193 melatonina poderia restaurar o status antioxidante prejudicado em ratos diabéticos induzidos  
3194 por estreptozotocina (ANWAR; MEKI, 2003). Assim, sua administração à longo prazo  
3195 reduziu a hiperlipidemia e a hiperinsulinemia e restaurou a relação dos ácidos graxos  
3196 poliinsaturados no soro e tecidos de ratos diabéticos (NISHIDA, 2005).

3197         Desta forma, os processos fisiológicos de reparo que auxiliam as células da retina a  
3198 sobreviverem ao estresse incluem a liberação exacerbada de diversos fatores de crescimento e  
3199 citocinas (GARIANO; GARDNER 2005). No entanto, o aumento da liberação dessas  
3200 proteínas pode servir para manter a função neural, mas, se não equilibrada pode causar edema  
3201 de mácula e neovascularização, perpetuando tanto o dano vascular como o neural  
3202 (ANTONETTI et al., 2006). Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar se a melatonina  
3203 exógena quando administrada simultaneamente a indução ao diabetes ou após sua  
3204 confirmação, poderia diminuir os danos causados por essas citocinas além de atenuar ou  
3205 mesmo evitar o processo apoptótico devido as suas propriedades antioxidantes,  
3206 imunomoduladora e anti-apoptótica

3207

## 3208 **2. Materiais e Métodos**

3209

3210         Foram utilizados 50 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, com  
3211 90 dias de idade, pesando em torno de  $300 \pm 30$ g, procedentes do Biotério do Departamento  
3212 de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para isto,  
3213 este projeto foi submetido ao comitê de ética institucional e aprovado sob número de

3214 protocolo 23082.022.699/2013 e licença N° 011/2014. Esses animais foram mantidos em  
3215 gaiolas, com alimentação e água *ad libitum*, na temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  e iluminação artificial  
3216 que estabeleceram um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o  
3217 período de luz das 06:00 às 18:00 h. Os animais foram divididos ao acaso em 5 grupos, cada  
3218 um com 10 animais: **GC**: ratos sem indução ao diabetes pela estreptozotocina; **GD**: ratos  
3219 induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com placebo; **GDM**: ratos induzidos ao  
3220 diabetes pela estreptozotocina e após confirmação do diabetes tratados com melatonina na  
3221 dosagem de 10 mg/kg de peso corporal durante 20 dias; **GDMS**: ratos induzidos ao diabetes  
3222 pela estreptozotocina e simultaneamente tratados com melatonina na dosagem de 10 mg/kg de  
3223 peso corporal durante 20 dias; **GDI**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e após  
3224 confirmação do diabetes tratados com insulina durante 20 dias.

3225

## 3226 *2.1 Indução do diabetes*

3227

3228 O diabetes foi induzido pela administração intraperitoneal de solução de  
3229 estreptozotocina (Sigma Chemical Co., USA) após jejum alimentar de 14 horas e confirmado  
3230 no sétimo dia após a aplicação. A estreptozotocina foi diluída em tampão citrato de sódio a 10  
3231 mM e pH 4,5, na dosagem única de 60 mg/kg de peso do animal. Os animais não diabéticos  
3232 (grupo controle) receberam da mesma forma, doses equivalentes de solução salina e  
3233 decorridos 30 minutos da administração todos os animais foram alimentados normalmente  
3234 (DALL'AGO et al., 2002). Foram incluídos no estudo apenas animais que apresentaram  
3235 glicose sanguínea acima de 200 mg/dL (Glicosímetro Kit Accu-Chek Activ), exceto do grupo  
3236 controle, para início do tratamento com a melatonina ou insulina.

3237

3238            *2.2 Administração da melatonina*

3239

3240            A administração da melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi realizado por meio  
3241 de injeções subcutânea no início da noite (18:00) durante 20 dias (GUVEN et al., 2006) na  
3242 dosagem de 10 mg/kg (SUDNIKOVICH et al., 2007). A melatonina foi dissolvida em etanol  
3243 e diluída em salina na proporção de 1:9 (OZGUNER; BARDAK; COMLEKCI 2006).

3244

3245            *2.3 Administração de insulina*

3246

3247            A insulina foi administrada por via subcutânea durante 20 dias, na dose de 5 U/dia,  
3248 sendo duas unidades de insulina às 10 h e 3 unidades restantes às 19 h (PINHEIRO et al.,  
3249 2011).

3250

3251            *2.4 Imunohistoquímica (IL6, TNF- $\alpha$ , VEGF)*

3252

3253            Para análise imunohistoquímica, as lâminas foram desparafinizadas e reidratadas em  
3254 xilol e alcoóis. A recuperação antigênica foi realizada através de uma solução de tampão  
3255 citrato (pH 8.0) em alta temperatura no microondas por 5 minutos. A peroxidase endógena foi  
3256 inibida através de uma solução de peróxido de hidrogênio (3%) em metanol. A reação  
3257 antígeno-anticorpo inespecífica foi bloqueada através da incubação das lâminas em PBS e  
3258 albumina sérica bovina (BSA) 5% durante uma hora. Todos os anticorpos (Santa Cruz  
3259 Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) foram diluídos em PBS/BSA 1% por uma hora.

3260 Subsequentemente, as lâminas foram tratadas com o anticorpo secundário por trinta minutos.  
3261 A reação antígeno-anticorpo foi observada através de um precipitado marrom após aplicação  
3262 de 3,3 diaminobenzidina por quatro minutos e contracorados com hematoxilina. As imagens  
3263 foram capturadas por meio de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus®  
3264 Bx50, as quais foram submetidas ao aplicativo Gimp 2.0 para a quantificação por meio de  
3265 Histograma RGB (Red-Green-Blue), o qual se baseia na intensidade de luminescência onde os  
3266 tons dos pixels da imagem variam de 0 a 255, sendo que o tom 0 representa o escuro absoluto  
3267 (menor luminescência), enquanto que o tom 255, representa o branco absoluto (maior  
3268 luminescência) (OBERHOLZER et al., 1996; LEE et al., 2001).

3269

## 3270 *2.5 Índice apoptótico (IA)*

3271

3272 Foi utilizado o método TUNEL como indicador de apoptose. Os cortes foram  
3273 inicialmente desparafinados e hidratados e, logo em seguida, incubados em PBS por 5  
3274 minutos à temperatura ambiente. Após, a Proteinase K foi aplicada sobre as lâminas por 15  
3275 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas em peróxido de hidrogênio  
3276 por 5 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em PBS e incubados em  
3277 tampão equilíbrio por 60 minutos a 4°C. Depois, os cortes foram incubados em TdT a 37° por  
3278 1 hora em câmara úmida. Foi aplicada a solução stop por 10 minutos em temperatura  
3279 ambiente, em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas em anti-digoxigenina.  
3280 As lâminas foram enxaguadas em PBS e os cortes revelados com substrato cromogênico  
3281 diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™) ( $\pm 20$  minutos), sendo contracorados com  
3282 hematoxilina por 20 a 30 segundos. Após isso, as lâminas foram lavadas em água corrente,  
3283 desidratadas em concentrações crescentes de álcool e colocadas em xilol para serem montadas

3284 e observadas em microscópio de luz. O índice apoptótico foi determinado pela contagem da  
3285 porcentagem de células positivas a partir de, pelo menos 500 núcleos subdivididos em 10  
3286 campos escolhidos aleatoriamente utilizando-se a objetiva de 40X (WU et al., 2013).

3287

## 3288 *2.6 Análise estatística*

3289

3290 Os dados da quantificação do índice apoptótico, do IL6, TNF $\alpha$  e VEGF foram  
3291 submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, e as médias foram comparadas pelo  
3292 teste de Dunn ( $P < 0,05$ ).

3293

## 3294 **3. Resultados**

3295

### 3296 *3.1 Níveis glicêmicos*

3297

3298 Antes da indução do diabetes os animais de todos os grupos experimentais não  
3299 apresentaram diferenças significativas nos níveis de glicose sanguínea, mostrando valores  
3300 abaixo de 120 mg/dL. Após a indução, todos os animais, com exceção os do grupo controle  
3301 (GC), apresentaram níveis sanguíneos de glicose acima de 300 mg/dL, diferindo  
3302 significativamente deste grupo, confirmando assim o quadro de diabetes. Após 10 e 20 dias de  
3303 administração com melatonina ou insulina evidenciou-se que o único grupo que apresentou  
3304 níveis semelhantes ao grupo controle foi o administrado com insulina (GDI). No entanto, o  
3305 grupo GDMS apresentou valores hiperglicêmicos menores, indicando diferença estatística em  
3306 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- $\alpha$ , 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 $\alpha$  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

3330 da expressão do fator TNF $\alpha$  revelou redução significativa dos pixels nos grupos GD e GDI  
3331 em relação aos demais grupos experimentais, sem, no entanto diferirem entre si (Fig. 17).

3332 Com relação ao VEGF-A na retina, observou-se nos grupos GC, GDM e GDMS fraca  
3333 marcação, e nos grupos GD e GDI moderada marcação nas camadas nuclear interna e externa.  
3334 A quantificação em pixels da expressão do fator VEGF-A revelou redução significativa dos  
3335 pixels entre os grupos GD e GDI, e também em relação aos outros grupos experimentais (Fig.  
3336 18).

3337 A análise estatística revelou que apenas os tratamentos com melatonina (GDM e  
3338 GDMS) apresentaram índice apoptótico com valores similares aos do grupo controle (CG).  
3339 Não houve diferenças significativas entre os grupos diabético (GD) e tratado com insulina  
3340 (GDI), os quais apresentaram os maiores índices. Entretanto, este último grupo não  
3341 apresentou diferença significativa em relação ao grupo GDM, diferindo apenas dos grupos  
3342 GC e GDMS (Fig. 19).

3343

#### 3344 **4. Discussão**

3345

3346 O VEGF é um fator angiogênico citoprotetor, que pode ser ativado mediante vários  
3347 insultos, como por exemplo, a hiperglicemia, tendo o estresse oxidativo como fator chave  
3348 para sua produção (ÖZDEMİR et al., 2014). Esse fator se distribui normalmente através da  
3349 retina, sendo mais expresso na camada de fibras nervosas, principalmente nas proximidades  
3350 do disco óptico, e em torno de grandes vasos (RAJALA et al., 2000). Além disso, o esse fator  
3351 tem sido relacionado a modificações observadas na RD, incluindo o edema de retina,  
3352 dilatação vascular, isquemia, hemorragias e formação de microaneurismas (ÖZDEMİR et al.,  
3353 2014), sendo essencial na formação e sobrevivência dos vasos sanguíneos por inibir a

3354 apoptose das células endoteliais (CHERNIKH et al., 2014). Contudo, por ser induzido por  
3355 hipóxia, o VEGF torna-se um importante mediador de neovascularização intraocular  
3356 patológica (VALIATTI et al., 2011), assim, tem sido relatado que níveis elevados de VEGF  
3357 pode ser um acontecimento desencadeador da retinopatia diabética (ÖZDEMIR et al., 2014).

3358 Apesar da relação do VEGF com a RD, esse fator de crescimento é verificado bem antes  
3359 do início do processo angiogênico decorrido na retinopatia (BENTO; DUARTE 2011). Além  
3360 disso, é fator marcante a presença de receptores para VEGF na retina normal, sugerindo um  
3361 papel importante desse fator de crescimento na função ocular normal (LAAKSO 1999).  
3362 Ademais, as células endoteliais da retina possuem vários receptores para VEGF (AMERICAN  
3363 DIABETES ASSOCIATION, 1998).

3364 Bento; Duarte (2011) relataram que em modelos experimentais de diabetes, a expressão  
3365 do gene para VEGF, mostrou-se aumentada nas camadas ganglionar e nuclear interna da  
3366 retina e que o conteúdo de VEGF no fluido vítreo/ocular é bem mais elevado em indivíduos  
3367 com RD proliferativa do que em indivíduos com RD simples (RAJALA et al., 2000).

3368 Nossos resultados mostraram uma marcação moderada deste fator na camada nuclear  
3369 interna e externa no grupo diabético e no grupo insulina. No entanto fraca, nos grupos tratados  
3370 com melatonina. Hu (1997) mostrou que a melatonina reduziu a regulação positiva do VEGF  
3371 no melanoma ocular em humanos, causado pela ativação da via de sinalização da proteína  
3372 kinase (PKC), a qual é uma das vias que conduz a patogênese da RD (UK PROSPECTIVE  
3373 DIABETES STUDY GROUP 1998). Além disso, receptores de melatonina estão presentes  
3374 em várias células oculares, como por exemplo, no epitélio pigmentar da retina, nos  
3375 fotorreceptores, células horizontais, amácrinas e ganglionares (TOSINI et al., 2012). A  
3376 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.

3399 A análise imunohistoquímica para TNF- $\alpha$  apresentou marcação moderada no grupo  
3400 diabético e no grupo tratado com insulina. O TNF- $\alpha$  é um mediador inflamatório de morte  
3401 neuronal após injúria isquêmica no cérebro e retina (TEZEL; WAX 2000). O papel do TNF-  $\alpha$   
3402 em uveítes foi estabelecido e sua neutralização provou ser eficaz na preservação da acuidade  
3403 visual e na diminuição da apoptose e lesão inflamatória (MURPHY et al., 2004). Estudos  
3404 também têm mostrado regulação positiva de receptores para esta citocina em retinas humanas  
3405 com glaucoma (TEZEL et al., 2001). Além disso, Tezel; Wax (2000) relataram que a  
3406 isquemia dos vasos da retina, induziu à produção positiva de TNF- $\alpha$  e morte celular por  
3407 apoptose em cultura de células ganglionares da retina. Berger et al. (2008) trabalhando com  
3408 neutralização in vivo do TNF-  $\alpha$ , durante significativa isquemia da retina, observou que foi  
3409 preservada a função da mesma, dados evidenciados pelos resultados do eletrorretinograma.

3410 No entanto, foi observado que a melatonina também conduziu a uma redução desse  
3411 fator nos grupos tratados com esse hormônio, ocasionando uma diminuição na destruição  
3412 tecidual que ocorre durante o processo inflamatório. Dessa forma, ela pode ser considerada  
3413 uma opção no tratamento nas condições que cursam com a inflamação (CAUMO et al., 2007).

3414 É amplamente conhecido que a apoptose nas células da retina é um fenômeno  
3415 estabelecido na retinopatia diabética (KOWLURU; CHAN 2007). O que pode ser confirmado  
3416 nesta pesquisa, em que o grupo diabético e o grupo insulina apresentaram os maiores índices  
3417 apoptóticos.

3418 Exposição dos pericitos e células endoteliais a altas doses de glicose como em animais  
3419 com diabetes ocasiona um aumento no estresse oxidativo, na atividade das caspases-3 e em  
3420 outros fatores de transcrição, os quais levam a morte de células capilares (KOWLURU;  
3421 ABDAS; ODENBACH 2004).

3422 Feit-Leichman et al. (2005) observaram marcação positiva nas células da  
3423 microvasculatura retiniana de ratos e camundongos com 6 a 8 meses de diabetes. O  
3424 mecanismo pelo qual o estresse oxidativo pode aumentar a apoptose parece complexo, mas  
3425 poderia envolver o aumento na peroxidação lipídica em membranas e lesões oxidativas em  
3426 macromoléculas essenciais para a função celular e alterações nos sinais de transdução e  
3427 expressão de genes (MATSURA et al., 1999).

3428 Pesquisas sugerem que o receptor de insulina é responsável por funções tróficas no  
3429 cérebro (PLUM; SCHUBERT; BRUNING 2005), Estudos demonstram que a insulina  
3430 estimula receptores específicos na retina (REITER et al., 2006) e que estes receptores estão  
3431 diminuídos em ratos diabéticos, e a sua deleção ocasiona degeneração dos neurônios da retina  
3432 e fotorreceptores (YI et al., 2005). Desta forma, o decréscimo do estímulo anabólico pela  
3433 insulina pode influenciar para a morte das células da retina (ANTONETTI et al., 2006).  
3434 Assim, pode-se afirmar que a longo prazo, os distúrbios na ação da insulina no tecido  
3435 retiniano pode acelerar a morte celular e prejudicar atividades anabólicas que dependem de  
3436 insulina como a síntese proteica (CHIHARA 1981).

3437 Alguns autores mostraram ação anti-apoptótica da melatonina em diferentes órgãos,  
3438 como timo, rim, cérebro e fígado e, atribuem isso principalmente a suas propriedades  
3439 antioxidantes (KOH 2008; JOUBERT; MARAIS; MARITZ 2009), ao eliminar radicais  
3440 hidroxila, peroxila, superóxidos e a oxidação da cardiolipina nas mitocôndrias (PARADIES et  
3441 al., 2010). A glutatona peroxidase, uma enzima de grande importância na eliminação de  
3442 radicais livres no organismo, também sofre aumento de sua produção em cérebro de ratos  
3443 tratados com melatonina (WEISHAU et al., 2006). Além disso, Wang (2009) relatou que a  
3444 melatonina atuaria na prevenção de doenças neurodegenerativas pela inibição da via  
3445 intrínseca da apoptose e pela ativação de vias de sobrevivência.

3446 No tecido nervoso e renal, a melatonina ocasiona queda nos níveis de expressão das  
3447 proteínas pró-apoptóticas como a Fas, Fas-L e p-53 assim como aumenta a expressão de  
3448 proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2 (BOATRIGT; SALVESEN 2003).

3449 Assim, concluiu-se neste estudo que a suplementação com melatonina repercutiu  
3450 positivamente sobre a regulação da expressão de citocinas inflamatórias e sobre a diminuição  
3451 do índice apoptótico na retina de ratos com retinopatia diabética. Assim, a melatonina atuou  
3452 como um mediador inflamatório, protegendo a retina, sendo um possível recurso terapêutico  
3453 nesta enfermidade, graças às suas atividades anti-inflamatória e anti-oxidantes.

3454

## 3455 **5. Referências**

3456

3457 Aiello, L. P. Angiogenic pathways in diabetic retinopathy. *Engl. J. Med*, v.353, n.8, p. 839-  
3458 841, 2005.

3459 Alvarez-García, V.; González, A.; Alonso-González, C.; Martínezcampa, C.; Cos, S.  
3460 Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. *J.*  
3461 *Pineal. Res*, v. 54, n. 4, p. 373-380, 2013.

3462 American Diabetes Association. Consensus development conference on the diagnosis of  
3463 coronary heart disease in people with diabetes. American Diabetes Association, *Diabetes*  
3464 *Care*, v. 21, p. 1551-1559, 1998.

3465 Antonetti, D. A.; Barber, A. J.; Bronson, S. K.; Freeman, W. M.; Gardner, T. W.; Jefferson,  
3466 L. S.; Kester, M.; Kimball, S. R.; Krady, J. K.; Lanoue, K. F.; Norbury, C. C.; Quinn, P. G.;  
3467 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- $\alpha$  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 reinstatement 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.; zabrodszkaya, 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 alpha 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-alpha and TNF-alpha 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 (7° dia)	Meio do tratamento (10°dia)	Fim do tratamento (20°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

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 ( $p < 0,05$ ).

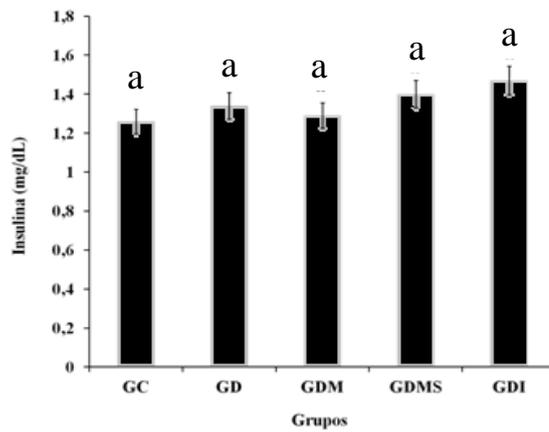
3659

3660

3661

3662

3663



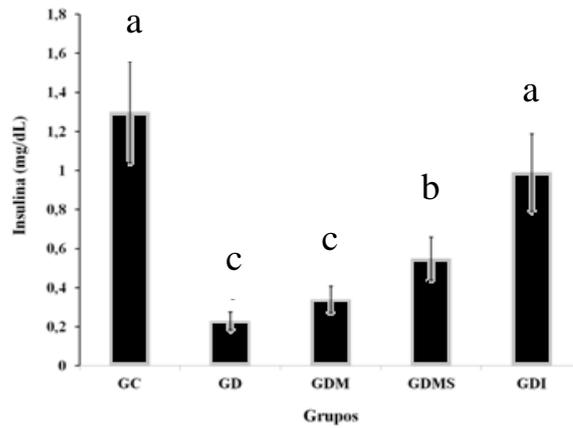
A

3664

3665

3666

3667



B

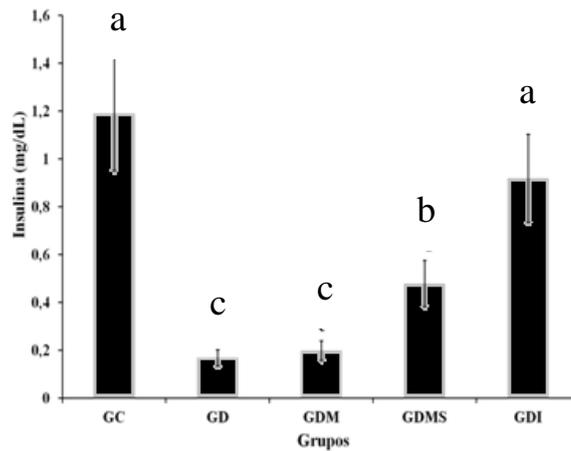
3668

3669

3670

3671

3672



C

3673

3674

3675

3676

3677

3678

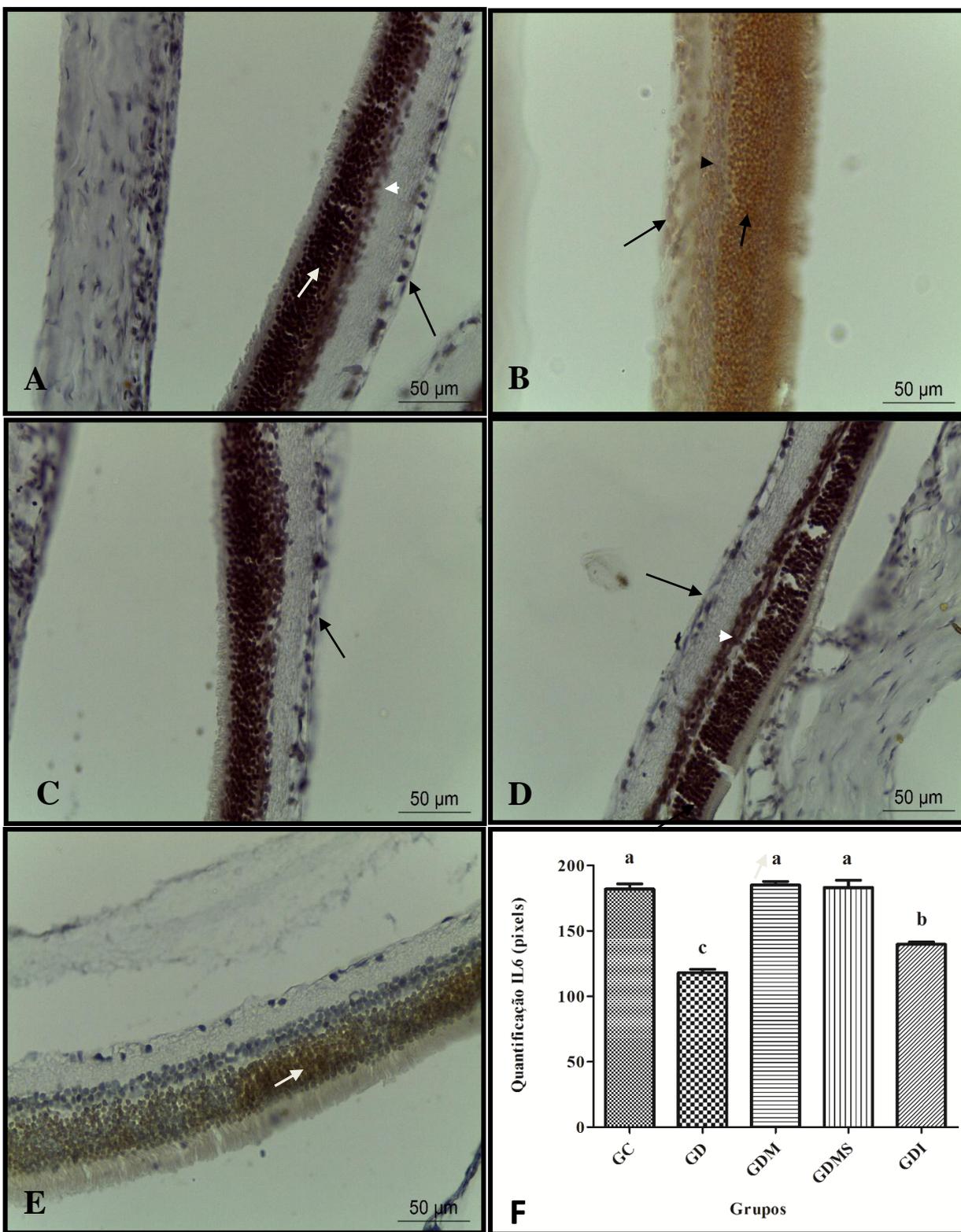
3679

3680

3681

**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 ( $p < 0,05$ ).

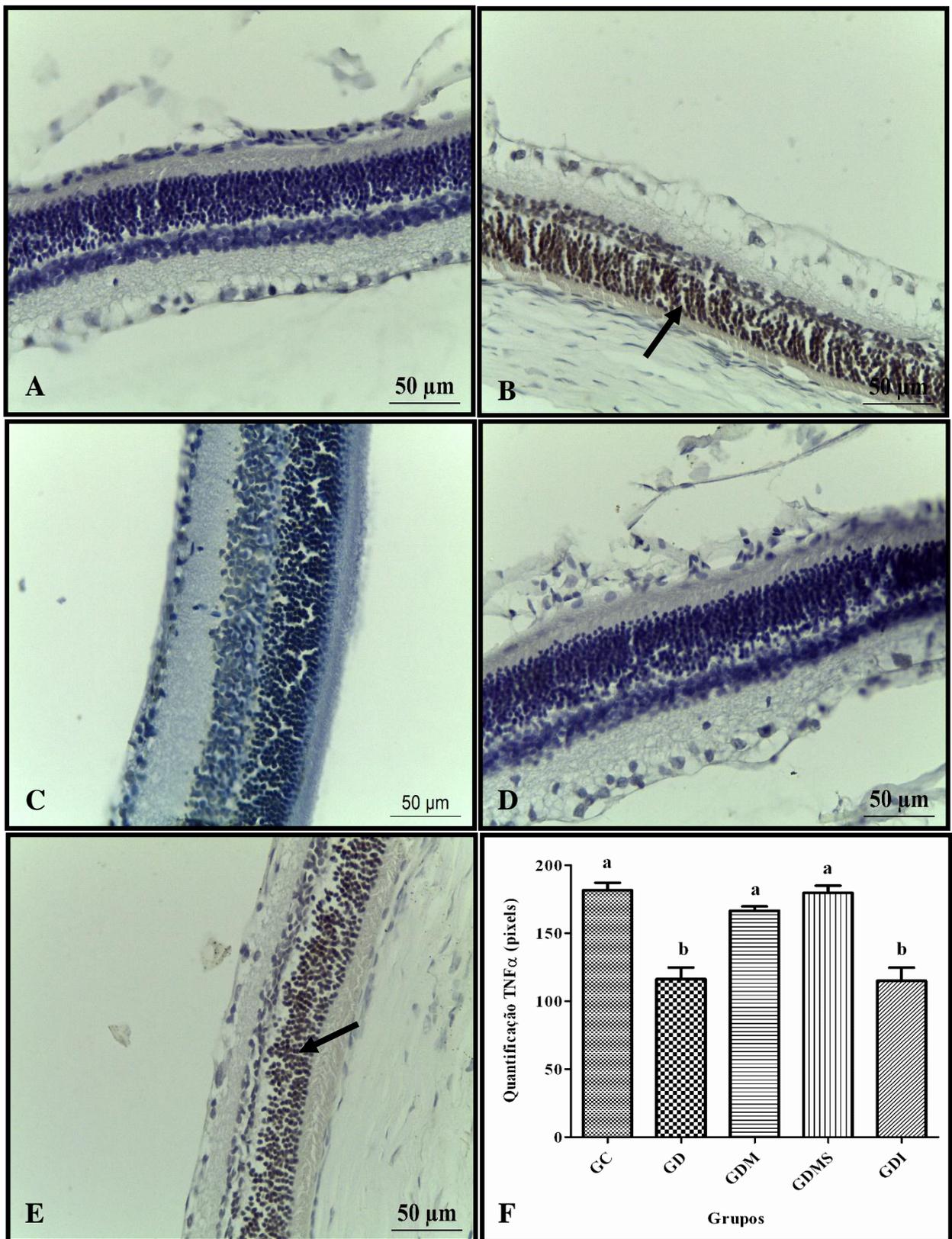
3682  
 3683  
 3684  
 3685  
 3686  
 3687  
 3688  
 3689  
 3690  
 3691  
 3692  
 3693  
 3694  
 3695  
 3696  
 3697  
 3698  
 3699  
 3700  
 3701  
 3702



3703 **Figura 16:** Imunohistoquímica e quantificação do IL6 na retina. Observar em A (GC), C  
 3704 (GDM) e D (GDMS) fraca marcação, em B (GD) forte marcação nas camadas ganglionares  
 3705 (seta longa), nuclear interna (cabeça da seta) e nuclear externa (seta curta), enquanto que em E  
 3706 (GDI) nota-se moderada marcação apenas na camada nuclear externa (seta branca). F –  
 3707 Quantificação em pixels da expressão do fator IL6. Notar redução significativa dos pixels  
 3708 entre os grupos GD e GDI, e em relação aos demais grupos experimentais. \*Médias seguidas  
 3709 pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com  
 3710 post-hoc Dunn ( $p < 0,05$ ).

3711

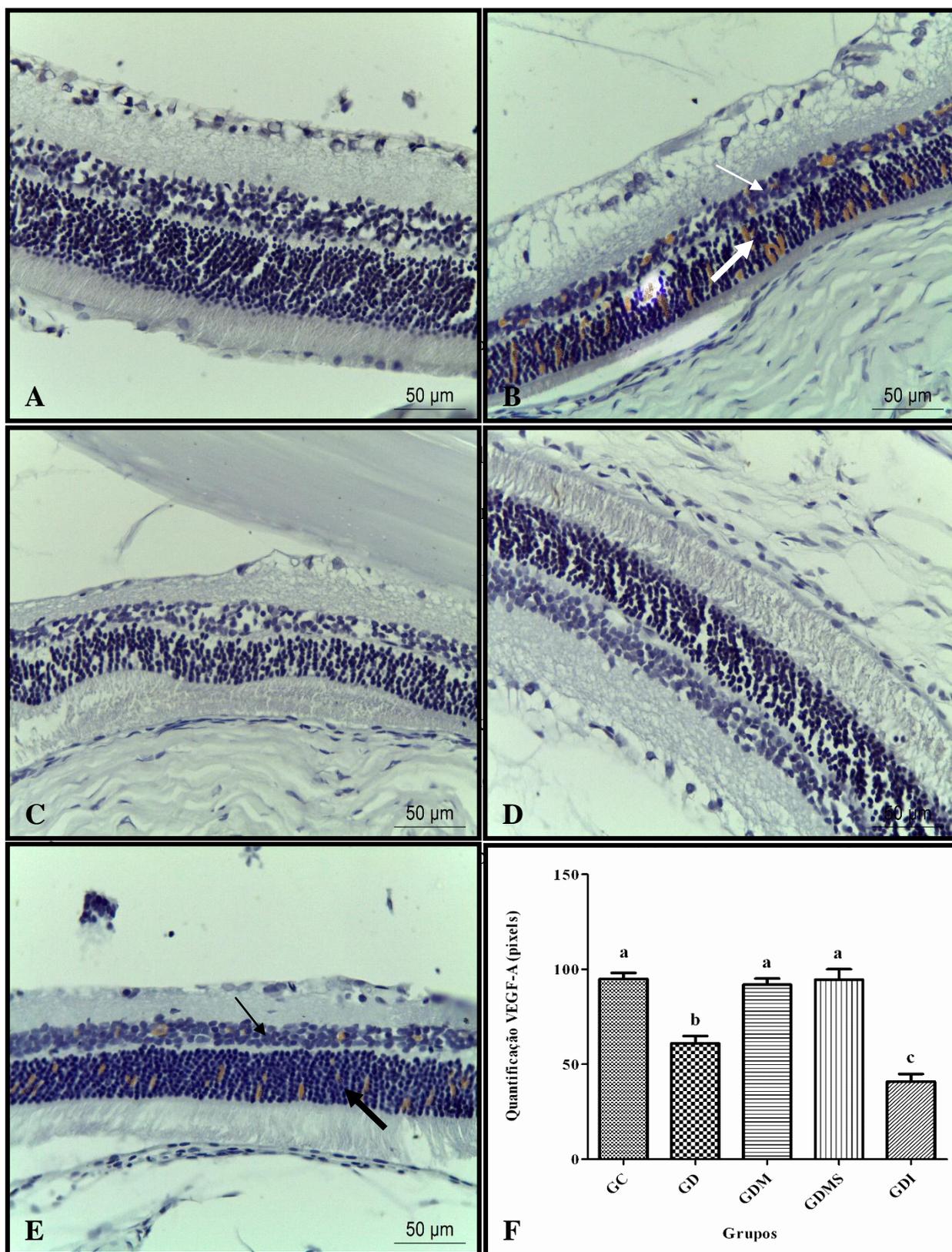
3712  
3713  
3714  
3715  
3716  
3717  
3718  
3719  
3720  
3721  
3722  
3723  
3724  
3725  
3726  
3727  
3728  
3729  
3730  
3731  
3732  
3733



3734 **Figura 17:** Imunohistoquímica e quantificação do TNFα na retina. Observar em A (GC), C  
3735 (GDM) e D (GDMS) fraca marcação, em B (GD) e E (GDI) moderada marcação apenas na  
3736 camada nuclear externa (seta). F – Quantificação em pixels da expressão do fator TNFα.  
3737 Notar redução significativa dos pixels nos grupos GD e GDI em relação aos demais grupos  
3738 experimentais. \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si  
3739 pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ( $p < 0,05$ ).

3740

3741  
3742  
3743  
3744  
3745  
3746  
3747  
3748  
3749  
3750  
3751  
3752  
3753  
3754  
3755  
3756  
3757  
3758  
3759  
3760



3761 **Figura 18:** Imunohistoquímica e quantificação do VEGF-A na retina. Observar em A (GC), C  
3762 (GDM) e D (GDMS) fraca marcação, em B (GD) e E (GDI) moderada marcação nas camadas  
3763 nuclear interna (seta fina) e externa (seta grossa). F – Quantificação em pixels da expressão  
3764 do fator VEGF-A. Notar redução significativa dos pixels entre os grupos GD e GDI, e em  
3765 relação aos outros grupos experimentais. \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem  
3766 significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ( $p < 0,05$ ).

3767

3768

3769

3770

3771

3772

3773

3774

3775

3776

3777

3778

3779

3780

3781

3782

3783

3784

3785

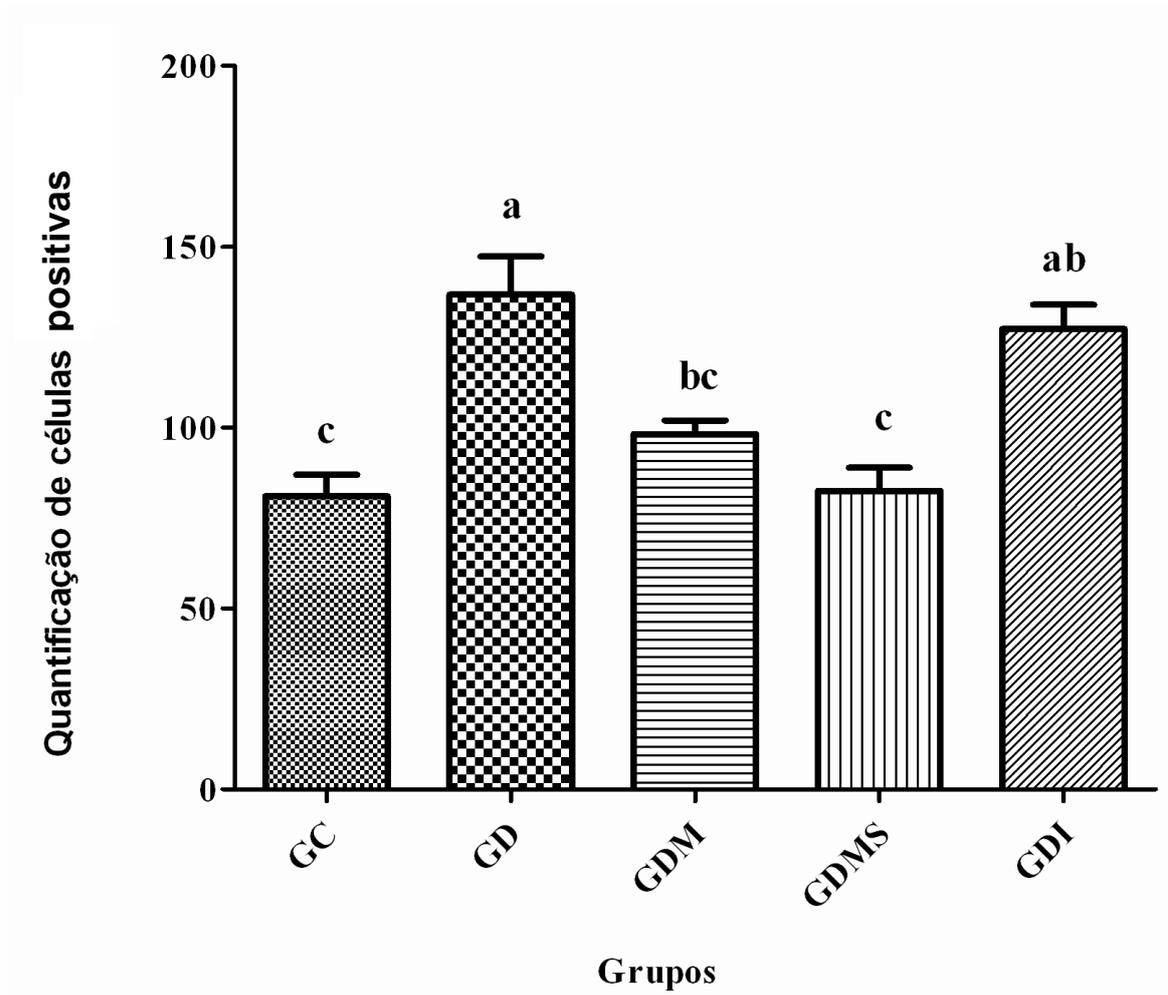
3786

3787

3788

3789

3790



**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 ( $p < 0,05$ ).