Daniella do Carmo Buonfiglio

***Estudo da síntese de melatonina
em retinas de ratos Wistar diabéticos***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

Daniella do Carmo Buonfiglio

***Estudo da síntese de melatonina
em retinas de ratos Wistar diabéticos***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Buonfiglio, Daniella do Carmo.

Estudo da síntese de melatonina em retinas de ratos Wistar diabéticos / Daniella Buonfiglio. -- São Paulo, 2010.

Orientador: José Cipolla Neto.

Dissertação (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Síntese de melatonina na retina e diabetes.

Versão do título para o inglês: Impairment of retinal melatonin synthesis in diabetic Wistar rat.

Descritores: 1. Melatonina 2. Retina 3. Diabetes 4. AANAT 5. Estreptozotocina 6. Insulina I. Colquhoun, Alison II. Universidade de São Paulo. Instituto de ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0211/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Daniella do Carmo Buonfiglio.

Título da Tese: Estudo da síntese de melatonina em retinas de ratos Wistar diabéticos.

Orientador(a): José Cipolla Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 06508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **79** nas fls. 09 do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Prof. Dr. José Cipolla Neto, Coordenador da Linha de Pesquisa "**O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: interações hormonais, ações centrais e periféricas: pineal, obesidade, diabetes e envelhecimento**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Sabrina Heloísa José dos Santos, Rodrigo Peliciari, Fernanda Gaspar do Amaral, Ana Lúcia Skorupa, Lillian C. Souza, Maria Isabel Cardoso Alonso-Vale, Cristina das Neves Borges Silva, Julie Takada, Sidney Barnabé Peres, Paula Mukai, Ronaldo Meira de Mello, Cecília Picinato, Thaís Martins de Lima**. Pesquisadores: **Fabio Bessa Lima, Silvana A Bordin da Silva, Carla Roberta O Carvalho, Ângela Rafael Carpinelli, Rui Curi, Antonio Carlos Cassola e Solange Castro Afeche** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa)** em **16.12.2004**.

São Paulo, 16 de dezembro de 2004.

Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEa

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEa

*Dedico essa tese a todas as pessoas
que me acompanharam de perto
nessa jornada.*

*Em especial ao meu marido Cano
e meus pais, Vicente e Jurema.*

AGRADECIMENTOS

Chegou o momento de expressar sinceros agradecimentos a meus adorados familiares e amigos, tanto aos “velhos” e queridos quanto aos “novos” que se revelaram ao longo desse tempo.

Se o desafio era grande as motivações eram enormes, somadas às espontâneas generosidades que fizeram possível a transformação de instantâneos momentos de angústia e sofrimento em um caminho menos árduo e mais iluminado! Talvez essa tese seja o resultado dessa rede de solidariedade e de muito, muito afeto. Dedico algumas palavras àqueles que dela fazem parte direta ou indiretamente ou, ainda, pelo fato de simplesmente existirem.

Agradeço a Deus por colocar pessoas maravilhosas e queridas na minha vida!

Agradeço aos meus pais, Vicente e Jurema, que contribuíram diretamente na minha formação, educando-me e ensinando valores morais e éticos.

Muito obrigada ao ‘Santo Cano’, já estou convencida de que ele seja um santo mesmo só pela paciência e por todo amor e cumplicidade que me é dado!

Agradeço a minhas irmãs Maria Amélia e Giu, que me ensinaram desde pequena o que é viver em “sociedade”!

A baby simplesmente por existir, foi mais um presente em nossas vidas!

A Dona Angela, minha sogra querida, por todo apoio que nos foi dado.

Agradeço ao chefe, Prof. Cipolla, por me acolher em seu laboratório e acreditar em mim, além de todo conhecimento doado esses anos todos.

Um agradecimento especial para Julieta, uma amiga, um anjo. Jú, amigos são para sempre, mesmo que o sempre não exista. Obrigada por tudo!

Ao Rô por sua amizade, “paciência” e pelas discussões quase sempre pacíficas!

Ao Prévilde, por ter se tornado um amigo querido tão rápido!

Agradeço ao Peres e a Ana, por tornarem as tardes sempre divertidas.

A Rosana Fátima uma pessoinha muito especial que adorei conhecer, obrigada por todas as risadas!

Agradeço a Fê por todos os experimentos e ensaios divididos, uma dupla com eficiência de 100%.

Agradeço a Jéssica, digo, Morango que confiou em mim e teve coragem de me chamar para sua banca do TCC.

Agradeço aos demais membros do laboratório o Marco, a Lia, o Ronaldo, a Carol e não poderia esquecer a Maria Alice! Obrigada a todos!

Agradeço a Dr^a. Solange por permitir que usássemos seu laboratório para realização dos ensaios de atividade enzimática!

Não posso deixar de agradecer aos mais antigos que me receberam de braços abertos, a Sabrina e Simoninha, saudades de vocês!

Muito obrigada aos meus “velhos” amigos Japinha e Lú! Vocês sabem que os amigos são a família que escolhemos né? E vocês já fazem parte da minha!

Ao CNPq que me concedeu uma bolsa durante a realização deste doutorado.

Agradeço ao Dr. Paul Pevet e a Dr^a. Mireille Masson-Pévet a oportunidade dada de trabalhar no departamento de Neurobiologia dos ritmos em Estrasburgo, França.

Agradeço, em especial, a Dr^a. Marie Paule Felder-Schmittbuhl e o Dr. David Hicks que me receberam tão afetuosamente no laboratório e me orientarem durante o ano que passei em Estrasburgo. Ano que foi divisor de águas em minha vida científica, pois foi por causa deles que comecei a trabalhar com retina, Merci Beaucoup!

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado!!!

La théorie est l'hypothèse vérifiée après qu'elle a été soumise au contrôle du raisonnement et de la critique. Une théorie, pour rester bonne, doit toujours se modifier avec le progrès de la science et demeurer constamment soumise à la vérification et la critique des faits nouveaux qui apparaissent. Si l'on considérait une théorie comme parfaite, et si on cessait de la vérifier par l'expérience scientifique, elle deviendrait une doctrine

Claude Bernard (1813 – 1878)

RESUMO

Carmo-Buonfiglio D. Estudo da síntese de melatonina em retinas de ratos Wistar diabéticos [tese (Doutorado em Fisiologia e Biofísica)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A retina está envolvida no sistema sincronizador endógeno assegurando o ajuste de suas funções às mudanças diárias na intensidade de luz. Como resultado, muitos fenômenos foram descritos sendo rítmicos. A síntese de melatonina na retina ocorre de maneira circadiana na camada fotorreceptora, e age localmente como um neuromodulador promovendo a adaptação fisiológica da retina ao escoto-período. Sabendo-se que o estresse oxidativo, decorrente da hiperglicemia, é um dos principais fatores que contribui com o desenvolvimento da retinopatia diabética, que a melatonina é conhecida por ser um dos maiores antioxidantes naturais e que há ainda uma escassez de dados na literatura sobre a síntese do referido indol mediante o quadro de diabetes, o objetivo do presente trabalho foi avaliar na retina de animais diabéticos o conteúdo de melatonina e as enzimas envolvidas em sua via de síntese ao longo das 24 horas. Para isso, ratos Wistar mantidos em biotério com ciclo claro-escuro de 12h/12h tiveram o quadro diabético induzido por STZ (60mg/kg, i.p.). Os animais diabéticos tratados com insulina receberam subcutaneamente 2U de insulina de liberação lenta no começo do dia e no começo da noite receberam 4U, sendo 2U de insulina regular mais 2U de insulina de liberação lenta, totalizando 6U por dia durante os três dias. Os animais foram sacrificados 3 dias pós-indução a cada 3 horas ao longo das 24 horas. Os resultados encontrados mostraram uma significativa redução no conteúdo de melatonina nas retinas dos animais diabéticos devido à diminuição de atividade da enzima AANAT e o tratamento com insulina foi eficaz em restabelecer ambos os parâmetros. Presume-se que a diminuição da atividade da AANAT seja um reflexo da redução no conteúdo de AMPc, já que o AMPc regula a estabilidade desta enzima por ativar PKA e esta, por sua vez, fosforila AANAT protegendo-a da degradação proteassomal, refletindo dessa forma na síntese de melatonina. As outras enzimas (TPH e HIOMT) envolvidas na síntese de melatonina não foram afetadas em 3 dias do início do quadro diabético, assim como a expressão gênica do transportador de glicose e do receptor de insulina. Mediante a esses dados, pode-se supor que as retinas dos animais diabéticos estão mais vulneráveis aos danos decorrentes do quadro diabético, já que a proteção antioxidante da melatonina está diminuída. Na patologia como o diabetes Mellitus o aumento do estresse oxidativo, devido ao aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, combinado com a diminuição da proteção antioxidante da melatonina, pode, possivelmente, ter um papel no desenvolvimento da retinopatia diabética.

Palavras-chave: Melatonina. Retina. Diabetes. AANAT. Estreptozotocina. Insulina.

ABSTRACT

Carmo-Buonfiglio D. Impairment of retinal melatonin synthesis in diabetic Wistar rat [Ph. D. thesis (Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Melatonin, synthesized mainly by the pineal gland, is also produced in the retina of several vertebrate species. Retinal melatonin synthesis occurs in the photoreceptor layer and, as observed in the pineal gland, shows a clear daily variation with low levels during the light period and high levels at night. This indolamine controls several retinal physiologic rhythmic phenomena, including the characteristic of being the most powerful natural free radical scavenger. The purpose of the present work is evaluating the diurnal profile of retinal melatonin content and the enzymes involved in its biosynthetic pathway in retinas of streptozotocin-induced diabetic rats. Male Wistar rats, entrained to a 12h:12h light/dark cycle, were diabetic-induced by an intraperitoneal injection of streptozotocin. Insulin-treated diabetic animals received 2U of subcutaneous long action insulin in the beginning of the day and a mix of 2U of regular and 2U of long action insulin in the beginning of the night for three days. Animals were sacrificed every 3 hours throughout the 24 h light-dark cycle for retinal melatonin content, enzymes activity, cAMP content and gene expression analysis. As expected, control animals showed a clear retinal melatonin daily rhythm with high levels at night. Interestingly, decreased retinal melatonin was observed in the diabetic group. On the other hand, immediate insulin treatment prevented melatonin synthesis reduction. In an attempt to investigate why retinal melatonin is reduced in diabetic rats, the daily AANAT activity profile was analyzed. The AANAT activity was higher in the dark and lower in the light period in the control group. On the contrary, this daily fluctuation was abolished in streptozotocin-induced diabetic rats and was completely restored in insulin-treated animals. It is known that cAMP level increase in the darkness stimulates *aanat* transcription via PKA and CREB. PKA also phosphorylates AANAT, leading to its association with 14-3-3 proteins that protect it from degradation. In this regard, we suppose the observed AANAT activity reduction is due to the reduced retinal cAMP content found in the diabetic group. The present data show a melatonin synthesis reduction in retinas of diabetic rats associated to a reduction in AANAT activity that may be prevented by insulin treatment. This impairment could compromise the physiological homeostasis in the retina where melatonin plays an important role modulating circadian functions.

Key words: Melatonin. Retina. Diabetes. AANAT. Streptozotocin. Insulin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAAD: “Aromatic L-amino acid decarboxylase”

AANAT: arilalquilamina N-acetiltransferase

Acetil CoA: acetil coenzima A

AC1: Adenilato ciclase 1

ADA: “American Diabetes Association”

AGEs: “Advanced Glycation Endproducts”

Akt: proteína quinase B

AMPC: adenosina monofosfato cíclico

ANOVA: método de análise de variância

ATP: Adenosina tri-fosfato

bHLH-PAS: “basic Helix-Loop-Helix - Period-Arnt-Single-minded”

BHRE: barreira hemato-retiniana externa

BHRI: barreira hemato-retiniana interna

cDNA: DNA complementar

CEEA: Comissão de Ética em Experimentação Animal

CCG: “clock controlled genes”

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CRE: “cAMP response element”

DAG: diacilglicerol

DHAP: dihidroxiacetona fosfato

DMEM: “Dulbecco's Modified Eagle Médium”

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: desorribonucleotídeo trifosfatado

DTT: Ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

FACS: “fluorescence-activated cell sorting”

FL2: fluorescência laranja-vermelhada – 585/542 nm

GAPDH: “Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”

GFAT: “Glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase”

GLUT1: transportador de glicose 1

GLUT2: transportador de glicose 2

GSH: “glutathione sulfhydryl”

HEPES: ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico

HIOMT: hidroxindol-oxi-metiltransferase

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

ICB: Instituto de ciências biomédicas

IDF: “International Diabetes Federation”

IGF-1: “insulin growth factor 1”

IGF-2: “insulin growth factor 2”

Insr: “Insulin receptor”

IPTG: isopropil-B-D-tiogalactosídeo

IP: Intraperitoneal

IP₃: trifosfato de inositol

IRS: substrato para o receptor de insulina

MT₁: receptor 1 de membrana para melatonina

MT₂: receptor 2 de membrana para melatonina

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NO: Óxido nítrico

NSQ: Núcleo supraquiasmático

PARP: poli (ADP-ribose) polimerase

PBS: Salina Tamponada Fosfatada

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PFGA: Produtos finais de glicosilação avançada

PI: Iodeto de propídeo

PINX: Pinealectomizados

PI3K: fosfatidilinositol 3–quinase

PKA: Proteína quinase A

PKC: Proteína quinase C

p70S6K: p70- ribossomal S6 quinase

RNA: Ácido ribonucléico

Rpl37a: Proteína ribossomal L37a

RRE: Elemento responsivo a receptores órfãos

ROR: Receptor nuclear órfão relacionado ao ácido retinóico

SH2: domínio com homologia a Src 2

SIDA: Síndrome da imunodeficiência adquirida

STZ: Estreptozotocina

SOC: “Super Optimal broth with Catabolite repression”

TPH: Triptofano hidroxilase

UDP-GlcNAc: Uridina difosfato-N-acetilglicosamina

VEGF: “Vascular endothelial growth factor”

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indoil-B-D-galactosídeo

ZT: “Zeitgeber Time”

8p-CPT-cAMP: “8-(p-chlorophenylthio)-cAMP”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Retina	17
1.2 Retina e o sistema circadiano	19
1.3 Bases moleculares do sistema circadiano	20
1.4 Síntese de melatonina na retina.....	22
1.5 Diabetes Mellitus.....	26
1.6 Retinopatia diabética.....	29
1.7 Papel da insulina na retina	30
1.8 Transporte de glicose na retina	32
1.9 Melatonina e retinopatia diabética	33
2 OBJETIVOS	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Animais	35
3.2 Desenho experimental	35
3.3 Indução de diabetes por estreptozotocina	36
3.4 Aferição da glicemia	36
3.5 Tratamento com insulina	36
3.6 Aferição da insulinemia.....	37
3.7 Dissociação celular.....	37
3.8 Avaliação da viabilidade celular (necrose) e da fragmentação do DNA (apoptose) por citometria de fluxo	37
3.9 Pinealectomia	38
3.10 Dosagem de melatonina por HPLC	38
3.11 Análise radiométrica da atividade enzimática	39
3.11.1 <i>Triptofano hidroxilase (TPH)</i>	39
3.11.2 <i>Arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT)</i>	40
3.12 Quantificação do AMP cíclico	41
3.13 Extração de RNA total	42
3.14 Obtenção de cDNA	42
3.15 Análise quantitativa da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.....	43
3.16 Clonagem e obtenção dos padrões	44
3.17 Análise estatística.....	47
4 RESULTADOS	48
4.1 Aferição da glicemia e insulinemia.....	48
4.2 Avaliação da viabilidade celular e da fragmentação do DNA	49
4.3 Dosagem de melatonina.....	51
4.3.1 <i>Perfil diário da melatonina retiniana após 3 dias de diabetes induzido por estreptozotocina</i>	51
4.3.2 <i>Quantidade de melatonina retiniana de animais pinealectomizados (Pinx) e animais intactos (controles)</i>	52
4.4 Atividade Enzimática	52
4.4.1 <i>Perfil de atividade da enzima AANAT retiniana após 3 dias de diabetes induzido por estreptozotocina</i>	52

4.4.2 Perfil de atividade da enzima TPH retiniana após 3 dias de diabetes induzido por estreptozotocina	53
4.5 Quantificação do AMP cíclico	54
4.6 Expressão gênica.....	55
4.6.1 Aanat.....	55
4.6.2 Tph	56
4.6.3 Hiomt	57
4.6.3 Adenilato ciclase 1 (AC1).....	57
4.6.4 Bmal1	58
4.6.5 Receptor de Insulina (Insr)	59
4.6.6 Glut1.....	60
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO A - Sequências dos padrões para PCR em tempo real.....	82
ANEXO B - Artigos publicados ou submetidos	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Retina

Apesar de sua localização periférica a retina tem sua origem no sistema nervoso central. Durante o desenvolvimento a retina forma-se a partir da evaginação do tubo neural, chamada de vesícula ótica. Esta invagina-se formando a cúpula ótica, onde a parede interna forma a retina neural e a parede externa forma o epitélio pigmentado (Purves et al., 2001).

A retina é um tecido de aproximadamente 0.5 mm de espessura e 42 mm de diâmetro, localiza-se à frente do epitélio pigmentado que delinea a parte posterior do olho (Webvision: the organization of retina and visual system, 2007). Em vertebrados é composta por três classes funcionais de neurônios: os fotorreceptores (bastonetes e cones), os interneurônios (células bipolares, células horizontais e células amácrinas) e as células ganglionares que também são fotorreceptoras e possuem a melanopsina como fotopigmento (Kandel et al., 2003).

Os corpos celulares e os contatos sinápticos desses neurônios estão organizados em cinco camadas, sendo os corpos celulares localizados na camada nuclear externa, camada nuclear interna e camada ganglionar, e os contatos sinápticos localizados nas camadas plexiforme interna e externa (Figura 1). A informação flui anteroposteriormente dos fotorreceptores para as células bipolares e dessas para as células ganglionares, bem como lateralmente por meio das células horizontais na camada plexiforme externa, e por meio das células amácrinas na camada plexiforme interna (Purves et al., 2001; Kandel et al., 2003).

Figura 1. Estrutura da retina. (A) Secção da retina: visão geral das camadas da retina. (B) Diagrama da circuitaria básica da retina. As células fotorreceptoras, bipolares e ganglionares provêm uma rota direta na transmissão da informação visual para o cérebro. As células horizontais e amacrinas medeiam à interação lateral nas camadas plexiforme externa e interna, respectivamente. Os termos, interno e externo, designam a distância relativa do centro do olho (interno, perto do centro do olho, externo, longe do centro do olho ou em direção ao epitélio pigmentar).
Fonte: Adaptado de Purves et al. (2001).

A camada fotorreceptora contém dois tipos celulares: cones e bastonetes. Os cones são responsáveis pela visão diurna e os bastonetes medeiam a visão noturna. Os bastonetes são muito sensíveis a luz, e, portanto, funcionam melhor com baixas intensidades de luz, como as que estão presentes nos crepúsculos ou à noite, quando a maioria dos estímulos é fraca demais para excitar os cones. Os cones desempenham funções em quase todas as tarefas visuais, exceto na detecção de estímulos fracos (Kandel et al., 2003).

Ambos os tipos de células fotorreceptoras possuem um segmento externo que é composto por discos membranosos que contêm o fotopigmento e localizam-se adjacentes a camada epitelial pigmentar. Esses discos desenvolvem-se como uma série de invaginações da membrana plasmática da célula, que por fim agrupam-se como pilhas de moedas (Purves et al., 2001; Kandel et al., 2003).

Nos cones, os discos são contínuos com a membrana plasmática, enquanto nos bastonetes eles se desprendem da membrana e tornam-se organelas intracelulares. Esses discos são sintetizados perto do segmento interno das células fotorreceptoras, onde se localiza

o núcleo celular, e movem-se para o segmento externo da célula onde são constantemente removidos por atividade fagocitária do epitélio pigmentar (Purves et al., 2001; Kandel et al., 2003).

1.2 Retina e o sistema circadiano

As transições noite / dia são os maiores eventos aos quais organismos vivos têm que se adaptar tanto em relação a processos fisiológicos como comportamentais. Muitos desses fatores mudam ritmicamente de acordo com o percurso de cada dia. Ritmos que ocorrem com uma periodicidade aproximadamente compatível a da rotação da Terra sobre seu próprio eixo, e que continuam na ausência do estímulo externo, são chamados de ritmos circadianos (Moore-Ede et al., 1982 apud Harmer et al., 2001). Os ritmos circadianos são controlados por um oscilador endógeno, o relógio circadiano, permitindo que organismos se antecipem às mudanças rítmicas do ambiente, mudando seu estado fisiológico e fornecendo uma vantagem adaptativa (Ouyang et al., 1998). Esses ritmos, embora dirigidos por um oscilador endógeno localizado nos Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ), são sincronizados com pistas ambientais diárias fólicas transmitidas pela retina (Hirota e Fukada, 2004), de forma que o ciclo claro-escuro ambiental determine a fase exata do relógio biológico (Moore, 1999).

O sistema circadiano é geralmente descrito em três partes: um oscilador central que gera a ritmicidade (NSQ), vias de entrada que recebem e conduzem as pistas ambientais em direção ao oscilador, e componentes de saída que geram os ritmos visíveis. Essa caracterização está simplificada, pois os componentes de entrada, como os fotorreceptores, podem ser também componentes de saída (Bognár, 1999; Emery, 1998) e mesmo os componentes de saída do relógio central (p.ex., secreção circadiana de melatonina e ritmo de atividade-reposo) podem retroalimentar o próprio relógio, regulando o ritmo do oscilador central (Lopez-Molina et al., 1997).

Além disso, sabe-se que à parte do NSQ, que é chamado de relógio mestre, há, em outros tecidos, relógios independentes que são chamados de osciladores periféricos e que, geralmente, exibem oscilações rítmicas intrínsecas de expressão dos genes relógio, ainda que, muitas vezes, defasada em relação ao ciclo dos genes do relógio presentes no NSQ (Green e Besharse, 2004). Pouco se sabe sobre o sinal que acopla esses osciladores (a melatonina poderia ser um elemento nesse processo), mas é claro que eles influenciam uns aos outros para gerar um sistema circadiano coordenado (Reppert e Weaver, 2002).

A retina está envolvida no sistema sincronizador endógeno assegurando o ajuste de suas funções às mudanças diárias na intensidade de luz. Como resultado, muitos fenômenos foram descritos como sendo rítmicos, como por exemplo, a descamação e fagocitose dos bastonetes (LaVail, 1976; Besharse e Dunis, 1983), a sensibilidade visual (Walker e Olton, 1979), o conteúdo de melatonina *in vivo* (Pang et al., 1980) e *in vitro* (Tosini e Manaker, 1998), a síntese de dopamina (Doyle et al., 2002), a amplitude de ondas b no eletrorretinograma (Brandenburg et al., 1983), o pH extracelular (Dmitriev e Mangel, 2001), a pressão intraocular (Boyd e Mcleod, 1964) e, por fim, a expressão dos genes do pigmento visual em fotorreceptores (Von Schantz et al., 1999). Muitos ritmos são sincronizados, pelo menos em parte, pela liberação rítmica da melatonina e/ou da dopamina de origem própria retiniana (Green e Besharse, 2004).

1.3 Bases moleculares do sistema circadiano

A nível molecular sabe-se que as alças de retroalimentação são os centros dos processos oscilatórios circadianos e o mais interessante é que ocorrem a nível transcricional dos genes relógio, criando um padrão oscilatório de expressão gênica que tem a propriedade de determinar a expressão rítmica dos chamados genes controlados pelo relógio (“clock controlled genes” - ccg), dirigindo, dessa forma, a expressão desses genes.

O relógio circadiano de mamíferos envolve duas alças de retroalimentação integradas compostas por elementos positivos e negativos (Figura 2). Os elementos positivos compreendem duas proteínas, CLOCK e BMAL1, com domínios bHLH-PAS (basic helix-loop-helix-PAS) que formam heterodímeros e ativam a transcrição dos genes relógio alvos (*Period (Per)*, *Cryptochrome (Cry)*) e dos genes controlados pelos relógio, por exemplo *Aanat* e *AC1*, por se ligarem no elemento E-box na região promotora desses genes (Munoz e Baler, 2003; Tosini et al., 2008).

Com a ativação dos genes relógio alvos, as proteínas PER se acumulam e formam complexos com as proteínas CRY. O complexo PER/CRY é chamado de complexo negativador, pois se transloca para o núcleo e interage diretamente com o complexo CLOCK/BMAL1, reprimindo sua atividade, fechando assim a alça de retroalimentação negativa (Green e Besharse, 2004; Ko e Takahashi, 2006).

Concomitantemente, a segunda alça de retroalimentação envolve a trans-ativação dos genes *Rev-erba* e *Rora* pelo complexo ativador CLOCK/BMAL1. As proteínas REV-ERB α e ROR α competem pela ligação no elemento RRE (elemento responsivo a receptores órfãos) na

região promotora do gene *Bmal1*, no qual REV-ERB α inibe e ROR α ativa a transcrição deste gene (Ko e Takahashi, 2006; Tosini et al., 2008).

Os componentes centrais dessa rede de alças de retroalimentação transcricional e traducional possuem um padrão rítmico de expressão de aproximadamente 24 horas (Lowrey e Takahashi, 2004). Existem fatores pós-traducionais, como a fosforilação, acetilação, ubiquitinação e degradação proteossomal, que regulam esse mecanismo gerador de oscilações circadianas (Tosini et al., 2008).

Esse padrão de expressão gênica rítmica, presente no núcleo supraquiasmático, é encontrado em diversos tecidos periféricos, entre eles, a retina.

Figura 2. O mecanismo molecular do relógio circadiano é composto por duas alças de retroalimentação. A alça de retroalimentação positiva envolve as proteínas CLOCK e BMAL1, que se heterodimerizam e ativam a transcrição dos genes *Per* e *Cry*, e genes controlados pelo relógio. No citoplasma as proteínas PER e CRY formam heterodímeros, entram no núcleo e interagem com CLOCK/BMAL1 inibindo esse complexo (alça de retroalimentação negativa). CLOCK/BMAL1 também estimulam a transcrição dos genes *Rev-erbα* e *Rora*. A proteína REV-ERB α inibe a transcrição de *Bmal1* e ROR α ativa a transcrição de *Bmal1*.

Fonte: Adaptado de Tosini et al. (2008).

1.4 Síntese de melatonina na retina

Melatonina (*N*-acetil 5-metoxitriptamina), sintetizada principalmente pela glândula pineal, é também sintetizada ritmicamente na retina de várias espécies de vertebrados. A síntese de melatonina na retina ocorre principalmente na camada fotorreceptora, onde ela age localmente como um neuromodulador promovendo a adaptação fisiológica ao escoto-período e regulando eventos circadianos que ocorrem na retina (Iuvone et al., 2005; Wiechmann e Summers, 2008).

A melatonina age através de receptores de membrana de alta afinidade, são os receptores MT1 e MT2 acoplados a proteína G_i que promovem uma redução na produção do AMPc (Morgan et al., 1994). O receptor MT₁, além de ligar-se à G_i , tem afinidade pela proteína $G_{q/11}$ que lhe confere a característica de poder aumentar a produção de diacilglicerol e IP₃, podendo resultar em maior concentração intracelular de cálcio e atividade da PKC (Barrett et al., 1998). Recentemente Baba et al.(2009) demonstraram que a melatonina modula funções retinianas durante a noite aumentando a performance visual via MT1, nesse mesmo estudo foi demonstrado que a melatonina aumenta a viabilidade dos fotorreceptores e das células ganglionares durante o envelhecimento também via MT1. Atualmente, o papel dos receptores de melatonina na retina não está muito bem definido.

A síntese de melatonina na retina (Figura 3), como na glândula pineal, ocorre a partir do aminoácido triptofano que é convertido em 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1), que em seguida é convertido em serotonina (5-hidroxitriptamina) por uma descarboxilase (AAAD- Descarboxilase de aminoácidos aromáticos). A serotonina, por sua vez, é acetilada em *N*-acetilserotonina pela aril-alquilamina-*N*-acetiltransferase (AANAT) e, por último, é metilada pela hidroxí-indol-oxi-metiltransferase (HIOMT), gerando a melatonina (*N*-acetil 5-metoxitriptamina) (Tosini e Fukuhara, 2003).

Figura 3. Via metabólica de síntese da melatonina.

Fonte: Adaptado de Cipolla-Neto e Afeche (2008).

AANAT é a enzima passo limitante da síntese de melatonina (Klein et al., 1996). Na retina a AANAT é expressa principalmente na camada fotorreceptora (Niki et al., 1998), porém já foi detectada na camada nuclear interna e nas células ganglionares (Coon et al., 2002; Liu et al., 2004).

A regulação da síntese de melatonina depende primariamente dos níveis de transcrição e atividade da enzima AANAT, ambos os fenômenos possuem variação circadiana com pronunciado aumento no período escuro.

Fukuhara et al. (2001) demonstraram que a exposição à luz de retinas *in vitro* no meio da noite reduz a atividade da enzima AANAT e, conseqüentemente, a síntese de melatonina aos níveis diurnos em 30 minutos.

Esse mesmo grupo demonstrou que a exposição à luz não altera a expressão do RNA mensageiro desta enzima, ficando claro que a redução de atividade é um fenômeno pós traducional devido à degradação da proteína AANAT pela proteólise proteassomal. Durante o período noturno, a proteína AANAT é fosforilada pela proteína quinase A (PKA) e então se associa à proteína 14-3-3 tornando-se mais estável e protegida da degradação proteolítica (Fukuhara et al., 2001; Iuvone et al., 2002; Pozdeyev et al., 2006).

As células fotorreceptoras despolarizam no escuro e hiperpolarizam em resposta à luz. No período de escuro, quando os fotorreceptores estão despolarizados, ocorre a abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem aumentando o influxo de Ca^{2+} . O aumento de Ca^{2+} intracelular ativa a enzima adenilato ciclase 1 (AC1) e conseqüentemente aumenta os níveis de AMP cíclico (Tosini e Fukuhara, 2003).

Existem diferentes isoformas de adenilato ciclase, a AC1 é neural específica e ativada pelo complexo Ca^{2+} /Calmodulina, sendo altamente expressa na camada fotorreceptora da retina (Xia et al., 1993).

A região promotora do gene da AANAT possui um elemento responsivo ao AMPc (CRE) (Baler et al., 1997) e um E-box (Chen e Baler, 2000). A presença de um E-box no gene da AANAT sugere que a transcrição desse gene está, também, sob o controle direto do relógio circadiano (Tosini e Fukuhara, 2003).

Desse modo, a transcrição desse gene é regulada tanto pelo aumento nos níveis de AMPc no escoto-período, como diretamente pelo relógio circadiano celular através do complexo CLOCK/BMAL1.

Esse mecanismo dual de regulação da transcrição da enzima chave AANAT e, conseqüentemente, regulação da síntese de melatonina representa a interação entre mudanças na luminosidade do ambiente e fenômenos rítmicos circadianos celulares (Fukuhara et al., 2004).

Além disso, existe uma sutil regulação que garante que a melatonina seja sintetizada somente durante o período noturno. Estudos demonstraram que a habilidade de estimular a síntese de melatonina retiniana com o escuro é dependente do período do dia no qual esse estímulo é aplicado. Quando retinas foram expostas por 6 horas ao escuro em diferentes períodos do dia, a síntese de melatonina só foi observada no final do dia (ZT9 – 15) e durante a noite (ZT12 – 18), enquanto que a estimulação no começo do dia (ZT0 – 6 e ZT3 – 9) não evocou resposta frente ao escuro (Fukuhara et al., 2004).

Nesse mesmo estudo as retinas foram incubadas com 8p-CPT-cAMP, um análogo do AMPc permeável à membrana que ativa a proteína quinase A (PKA), que induziu a síntese de melatonina em todos os períodos estudados, inclusive no começo do dia, mostrando que o mecanismo que controla a síntese de melatonina, garantindo sua produção somente no período noturno, está à montante do AMPc. Foi usado então, forskolin, um ativador direto da adenilato ciclase, que assim como o estímulo escuro falhou em induzir a síntese de melatonina

no começo do dia, indicando que, provavelmente, a enzima AC1 é o fator que limita a síntese de melatonina ao período da noite.

Análises de expressão do RNA mensageiro mostraram que os transcritos da enzima AC1 possuem um claro ritmo circadiano na retina e na camada fotorreceptora com pico de expressão no final do dia, enquanto os níveis da proteína AC1 assim como o conteúdo do AMP cíclico possuem altos valores durante a noite (Fukuhara et al., 2004).

O ritmo circadiano observado tanto ao nível transcricional quanto traducional da enzima AC1 é devido ao fato de haver um E-box na região promotora do gene desta enzima, que é, portanto, controlada pelos genes relógio através do complexo CLOCK/BMAL1 (Chan, 2001; Fukuhara et al., 2004).

Resumidamente, o relógio circadiano local regula a expressão rítmica dos transcritos do gene da Aanat através do complexo CLOCK/BMAL1 e sua interação com E-box na região promotora desse gene. Além disso, o relógio circadiano provém a expressão rítmica da enzima AC1 regulando temporariamente a habilidade do Ca^{2+} em estimular a síntese do AMPc. O escuro despolariza a membrana plasmática das células fotorreceptoras permitindo o influxo de Ca^{2+} e a síntese de AMPc somente quando a enzima AC1 está presente, no final do dia e à noite. Dessa forma a AC1 determina o período do dia em que o AMPc estará em seu nível máximo. O aumento do AMPc, durante o escuro, estimula a expressão do gene Aanat via PKA e CRE presente na sua região promotora, aumentando a síntese protéica, ao mesmo tempo em que promove a fosforilação da AANAT, levando a sua associação com a proteína 14-3-3. Essa associação protege a enzima AANAT de processos de ubiquitinação e destruição proteassomal (Figura 4).

Figura 4. Mecanismo pelo qual o relógio circadiano regula a expressão rítmica do gene *Aanat*.

Fonte: Adaptado de Tosini et al. (2008).

1.5 Diabetes Mellitus

A Federação Internacional de Diabetes (IDF) estima que mais de 245 milhões de pessoas em todo mundo têm diabetes. A expectativa é que esse número cresça para 380 milhões em 20 anos. A cada ano, 7 milhões de pessoas desenvolvem diabetes (www.idf.org, acesso em 26/05/2010).

Diabetes Mellitus é um grupo de distúrbios metabólicos caracterizado por hiperglicemia resultante de disfunções na secreção de insulina ou da perda progressiva de sua ação, ou ambos os fatores (American Diabetes Association, 2008).

Em 1997, a Associação Americana de Diabetes (ADA) estabeleceu novos critérios de classificação para cada tipo de diabetes e diagnóstico. Essa classificação do diabetes inclui quatro classes clínicas (ADA, 2009):

- Diabetes do tipo 1 - que resulta da destruição das células β pancreáticas, geralmente levando a uma deficiência absoluta de insulina, pode ser de origem auto-imune ou idiopática;
- Diabetes do tipo 2 - graus variados de diminuição da secreção e resistência à insulina;
- Outros tipos específicos devido a outras causas - defeitos genéticos da função da célula β , defeitos genéticos da ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino (ex. fibrose cística) e indução por drogas ou produtos químicos (como no tratamento da SIDA ou após transplante de órgão);
- Diabetes gestacional – diabetes diagnosticada durante a gravidez.

Quando a hiperglicemia se torna crônica, o substrato que normalmente é utilizado como fonte de energia se torna tóxico. Cronicamente, a alta concentração de glicose é a maior causa de retinopatias, nefropatias, neuropatias e doenças macrovasculares (Mehmet et al., 2008).

Existem quatro vias metabólicas descritas como sendo as grandes responsáveis pelo dano celular induzido pela hiperglicemia. A primeira delas descoberta é a do aumento no fluxo da via dos polióis, descrita por Gabbay et al. (1966) em nervos periféricos. Dez anos depois foi descoberto o aumento na formação de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) que está relacionada com o desenvolvimento de problemas microvasculares. No final dos anos 80, foi descoberto que a hiperglicemia ativa a via da proteína quinase C (PKC) levando a diversas consequências, uma delas é a diminuição da enzima óxido nítrico sintetase e o aumento da expressão da endotelina 1 que levam a anormalidades no fluxo sanguíneo, e finalmente, no final dos anos 90 foi visto um aumento no fluxo da via das hexosaminas com consequências na modificação de proteínas por N-acetil-glicosaminas (Brownlee, 2005; Mehmet et al., 2008).

Esses quatro mecanismos descritos refletem um único processo induzido pela hiperglicemia: o aumento na produção de superóxido pela cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (Brownlee, 2001).

O excesso de superóxido leva a diminuição da atividade da enzima chave da via glicolítica o gliceraldeído-3-fosfato-deidrogenase (GAPDH) e, em consequência, todos os elementos que estão acima da GAPDH na via glicolítica estão aumentados. O acúmulo dos metabólitos glicolíticos leva à ativação dos quatro mecanismos descritos acima (Figura 5) (Brownlee 2001, 2005).

Figura 5. Provável mecanismo pelo qual a produção excessiva de superóxido (O_2^-) pela mitocôndria, induzido pela hiperglicemia, ativa as 4 vias responsáveis pelas complicações diabéticas. O excesso de O_2^- inibe a enzima GAPDH, portanto todos os metabólitos da glicólise são desviados para as vias responsáveis pelas complicações diabéticas. O aumento do gliceraldeído-3-fosfato resulta em: fluxo aumentado de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) em diacilglicerol (DAG), um potente ativador da PKC e o aumento de metilglicoxal, o principal precursor intracelular dos AGEs. Já a frutose-6-fosfato é transformada em glicosamina 6-fosfato pela enzima GFAT, que posteriormente é convertida a UDP-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc) que modifica proteínas através do grupamento O-linked N-acetilglicosamina (GlcNAc). E, finalmente, o aumento do fluxo de glicose na via dos polióis consome NADPH e conseqüentemente diminui a glutatona reduzida (GSH)

Fonte: Brownlee, 2001.

A indução experimental do diabetes é feito por drogas químicas que agem através da destruição seletiva das células β nas ilhotas pancreáticas. As principais substâncias utilizadas são a estreptozotocina e a aloxana, que podem induzir tanto diabetes do tipo 1 como diabetes do tipo 2 (Szkudelski, 2001).

A estreptozotocina é uma alquil-nitrosourea isolada a partir da bactéria *Streptomyces achromogenes*. Devido a sua semelhança com a glicose essa molécula entra seletivamente na célula β através do transportador de glicose GLUT2 (Tjälve et al., 1976; Karunanayake et al., 1976). A ação intracelular tóxica da estreptozotocina é devido à atividade alquilante do seu grupamento metil-nitrosourea, que transfere o seu grupo metil para a molécula de DNA, resultando em fragmentação do DNA. Em resposta aos danos causados ao DNA, a enzima poli-ADP-ribose polimerase (PARP) tem sua ativação aumentada, resultando na diminuição

de NAD^+ e dos estoques de ATP. Essa depleção no estoque de energia celular resulta em necrose das células β (Lenzen, 2008).

Uma hipótese alternativa propõe que parte do efeito diabetogênico da estreptozotocina se deve a sua capacidade doadora de óxido nítrico (NO), porém o agente alquilante metil-metanosulfonato, que possui a maior toxicidade em células produtoras de insulina, não é uma molécula doadora de NO, indicando que o NO não é um pré-requisito para a obtenção da ação tóxica da família dos agentes alquilantes à qual a estreptozotocina pertence (Delaney et al., 1995).

1.6 Retinopatia diabética

A retinopatia diabética é definida como uma microangiopatia da retina que acomete quase todos os pacientes com diabetes melitus (Kollias e Ulbig, 2010).

Em pacientes com diabetes do tipo 1 os sinais clínicos da retinopatia aparecem antes de cinco anos após o início do diabetes, e quase todos os pacientes terão graus variados da retinopatia após 20 anos do início da doença. Já no diabetes do tipo 2, os sinais da retinopatia podem estar presentes no diagnóstico da doença, devido à longa duração da hiperglicemia subclínica até o diagnóstico (Shah, 2010).

Na retinopatia diabética ocorrem alterações microvasculares no tecido retiniano como a perda do tônus vascular, alteração do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e conseqüentemente extravasamentos e edemas e, por fim, obstrução vascular que leva à neovascularização, com vasos frágeis que se rompem, levando a hemorragias e descolamento da retina (Bosco et al., 2005).

Os níveis séricos elevados de glicose induzem uma série de anormalidades bioquímicas e celulares na retina que podem provocar as alterações vasculares encontradas. Como exemplo, aumento na atividade da via dos polióis, glicação não-enzimática de proteínas que aumenta a formação de produtos finais de glicosilação avançada (PFGA), estresse oxidativo e ativação da proteína kinase C pela síntese de diacilglicerol. Entretanto, até o presente momento, o exato mecanismo, ou o conjunto de mecanismos pelos quais a hiperglicemia leva à retinopatia, permanece obscuro (Bosco et al., 2005).

A combinação das alterações bioquímicas e hemodinâmicas leva à hipoperfusão da retina, desenvolvimento de anóxia e extravasamento vascular. A hipóxia que ocorre em algumas áreas da retina pode tanto estimular a produção quanto facilitar a ação dos fatores de

crescimento que irão desencadear a angiogênese, dentre eles o mais específico é o Fator Vascular de Crescimento Endotelial (VEGF) (Bosco et al., 2005).

O VEGF é fundamental no processo de neovascularização que ocorre na retinopatia diabética (Gariano e Gardner, 2005). Outros fatores de crescimento têm importância nesta patogênese, por exemplo, o fator de crescimento *insulina-like* 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2), o fator de crescimento transformador β e o fator de crescimento derivado do epitélio pigmentar (Kollias e Ulbig, 2010).

Clinicamente a retinopatia diabética é classificada em dois estágios: não proliferativo e proliferativo. A fase não proliferativa é caracterizada por alterações associadas ao aumento da permeabilidade capilar, como microaneurismas, edema macular e exudatos duros (extravasamento de lipoproteínas), e também à oclusão vascular que pode ou não ocorrer nesta fase. Quando a neovascularização aparece na interface vítrea da retina, a retinopatia é considerada então no estágio proliferativo (Bosco et al., 2005).

Alterações morfológicas na retina diabética ocorrem logo no início da patologia. Park et al. (2003) demonstraram em experimento com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina que os processos pós-sinápticos das células horizontais apresentaram degeneração com 1 semana após o início do diabetes. Após 4 semanas foram observadas células ganglionares necróticas e apoptose em poucas células fotorreceptoras que tiveram o número aumentado com o decorrer da doença, e com 12 semanas algumas células amácrinas e horizontais continham características necróticas.

Uma sutil redução na espessura das retinas diabéticas e uma notável redução na espessura da camada nuclear externa foram observadas após 24 semanas do início do diabetes (Park et al., 2003). Barber et al. (1998) demonstraram em retinas de ratos diabéticos por STZ a redução de 22% na espessura da camada plexiforme interna e 14% na espessura da camada nuclear interna, além de uma redução de 10% na sobrevivência das células ganglionares.

Com todas essas evidências a retinopatia diabética deve ser considerada como uma patologia que compromete tanto a viabilidade neuronal quanto a integridade vascular da retina.

1.7 Papel da insulina na retina

A insulina é absolutamente vital para os seres vivos. É um hormônio anabólico essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. Simplificadamente, a sinalização da insulina começa com a sua ligação a um receptor

específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades α e duas subunidades β , na qual a subunidade α inibe a atividade tirosina quinase da subunidade β . A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade quinase levando à alteração conformacional e autofosforilação. Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em tirosina. Muitos substratos já foram identificados entre eles os pertencentes à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS. A fosforilação em tirosina das proteínas IRS expõem sítios de reconhecimento para outras moléculas contendo domínios SH2. Dentre estas se destaca a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que é composta por uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A ligação dos sítios YMXM e YXXM (onde Y= tirosina, M= metionina e X= qualquer aminoácido) fosforilados das proteínas IRS ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI3K ativa o domínio catalítico associado. As proteínas alvo conhecidas dessa enzima são a Akt e as isoformas atípicas da aPKC (ζ e λ), porém a função destas proteínas no transporte de glicose ainda não está bem estabelecida (Carvalho et al., 2002).

A via de sinalização da insulina na retina esteve em pouca evidência até o final da década de 90. Trabalhos recentes mostram que neste tecido há uma grande expressão do receptor de insulina sendo a quantidade equivalente a encontrada no fígado e cérebro, além disso, possui um alto grau de fosforilação e atividade basal sendo ambos os parâmetros constantes frente ao ciclo de alimentação indicando um importante papel da insulina na fisiologia da retina (Reiter et al., 2006).

Puro e Agardh (1984) demonstraram que a regulação da maturação neuronal na retina é mediada pela insulina. Posteriormente, foi demonstrado nos neurônios da retina que a insulina provém o suporte trófico através da via da IRS/PI3K/AKT/p70S6K (Barber et al., 2001; Wu et al., 2004), e que essa função trófica da insulina na retina é prejudicada pela exposição a altas concentrações de glicose e glicosamina (Nakamura et al., 2001). A fosforilação da Akt^{ser473} foi descrita como um evento crucial na promoção da sobrevivência neuronal (Yano et al., 2001). Na retina a insulina estimula a fosforilação da Akt nas mesmas camadas de neurônios onde já fora descrito o aumento do número de células em apoptose decorrente do diabetes, sugerindo que a via da Akt é utilizada nos neurônios da retina como um sinal contínuo de sobrevivência (Barber et al., 1998; Reiter et al., 2003).

Dados recentes mostram que a luz é capaz de ativar o receptor de insulina na camada fotorreceptora de maneira independente, levando à ativação da PI3K e Akt provendo uma

proteção neural à retina contra os danos induzidos pela luz. O mecanismo pelo qual essa ativação ocorre não está muito bem definido, estudos recentes sugerem a relação entre a foto-ativação da rodopsina com a fosforilação tirosina do receptor de insulina (Rajala e Anderson, 2010).

A via de pró-sobrevivência da insulina (IRS/PI3K/AKT/p70S6K) está prejudicada na condição diabética contribuindo com a degeneração neuronal e o desenvolvimento da retinopatia diabética. Após quatro semanas do início do quadro diabético foi descrito uma significativa redução na atividade quinase do receptor de insulina, com posterior diminuição de expressão, autofosforilação e perda de atividade (Reiter et al., 2006). O tratamento de ratos diabéticos com insulina reduz o número de células da retina em apoptose. Em experimentos *in vitro*, a insulina protege células endoteliais da retina da apoptose induzida por meio de cultura com alta concentração de glicose (Barber et al., 1997), além disso é necessária para a sobrevivência de células ganglionares (Meyer-Franke et al., 1995).

A ausência da insulina leva a morte celular na retina, mas ainda não está esclarecido se essa é uma relação direta ou se é um efeito secundário devido ao um mecanismo indireto como a hiperglicemia (Barber et al., 1998).

1.8 Transporte de glicose na retina

O transporte de glicose na retina é mediado por uma proteína transportadora, o GLUT1. O GLUT1 é um membro da família dos transportadores de glicose expresso caracteristicamente em tecidos que possuem barreira, como a retina, que possui duas barreiras hemato-retinianas para a regulação da homeostase do tecido. A barreira hemato-retiniana interna (BHRI) consiste da formação de junções aderentes das células endoteliais dos capilares sangüíneos, e a barreira hemato-retiniana externa (BHRE) que é formada por junções aderentes das células do epitélio pigmentado (Fernandes et al., 2004; Kumagai et al., 1996).

Estudos com animais diabéticos induzidos por estreptozotocina mostraram uma diminuição na expressão de GLUT1 tanto em células do endotélio retiniano como em homogenato de retina inteira (Badr et al., 2000; Tang et al., 2000).

Fernandes et al. (2004) também mostraram uma redução na quantidade de GLUT1 na retina de animais diabéticos e em cultura de células endoteliais retinianas incubadas em meio com alta concentração de glicose. Porém, essa diminuição na quantidade de GLUT1 não foi acompanhada da redução do RNA mensageiro. O grupo sugere que a diminuição na

quantidade de GLUT1 é devido à ubiquitinação, já que houve uma reação cruzada com ubiquitina no imuno-precipitado de GLUT1.

1.9 Melatonina e retinopatia diabética

A melatonina é um dos mais poderosos antioxidante natural (Reiter et al., 1999), prevenindo danos oxidativos à macromoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Donder et al., 1999; Reiter et al., 2001).

Além de sua poderosa capacidade antioxidante, alguns de seus metabólitos gerados possuem essa mesma propriedade (Silva et al., 2004; Guenther et al., 2005), aumentando, dessa forma, a capacidade antioxidante da melatonina. Além disso, a melatonina estimula a expressão de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e glutathione peroxidase (Reiter et al., 2001; Baydas et al., 2001).

Mehmet et al. (2008) mostraram que a melatonina reduz danos na córnea de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina. E em um modelo de isquemia induzido, a melatonina bloqueia apoptose em células do epitélio pigmentar mantidas em cultura (Osborne et al., 1998).

No diabetes mellitus o aumento do estresse oxidativo, devido ao aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, combinado com a diminuição da proteção antioxidante da melatonina pode, possivelmente, ter um papel no desenvolvimento da retinopatia diabética (Obrosova et al., 2000).

A melatonina desempenha diversas funções nos seres vivos, dentre as suas ações intracelulares diretas pode-se ressaltar, além de seu papel antioxidante, sua ação na mobilização de mecanismos reparadores do DNA, sua ação regulatória direta da atividade de várias enzimas (ligando-se à cálcio-calmodulina e bloqueando quinases dela dependentes, por exemplo), sua ação intra-mitochondrial, regulando o metabolismo oxidativo e o transporte de elétrons, além de regular processos de apoptose celular (Mayo et al., 1998; Reiter et al., 2004).

Sabendo-se que o estresse oxidativo, decorrente da hiperglicemia, é um dos fatores principais que contribui para o desenvolvimento da retinopatia diabética, que a melatonina é conhecida por ser um dos maiores antioxidantes naturais e que, além disso, há ainda uma escassez de dados sobre a síntese do referido indol mediante o quadro de diabetes, torna-se essencial o desenvolvimento do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivos:

- Avaliar o perfil da síntese de melatonina retiniana em ratos adultos, tanto no grupo controle quanto nos grupos diabético e diabético tratado com insulina.
- Analisar na retina de animais controles e diabéticos a atividade das principais enzimas envolvidas na síntese de melatonina.
- Estudar na retina de animais controles e diabéticos o perfil de expressão gênica das principais enzimas envolvidas na síntese de melatonina.
- Avaliar na retina de animais controles e diabéticos a expressão gênica do receptor de insulina, do transportador de glicose (GLUT1), da enzima AC1 e do gene relógio *Bmal1*.
- Quantificar o conteúdo de AMPc nas retinas de animais controles e diabéticos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos albinos da linhagem Wistar com peso entre 250 e 280 g foram mantidos em biotério com ciclo claro-escuro de 12h/12h e temperatura controlada de 21 ± 2 °C por pelo menos duas semanas, para adequada adaptação ao ciclo, antes do início dos procedimentos experimentais. Durante todo o período de estudo, os animais receberam água e comida à vontade. Todos os procedimentos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB.

3.2 Desenho experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: controles, diabéticos e diabéticos tratados com insulina.

O esquema abaixo ilustra a organização temporal dos procedimentos de indução, aferição da glicemia, tratamento e sacrifício utilizados no decorrer do presente estudo. O sacrifício dos animais deu-se por decapitação, em diferentes horários ao longo do dia denominados deste ponto em diante de ZT - Zeitgeber Time.

ZT é uma nomenclatura utilizada para uniformizar os horários do ciclo circadiano sincronizado pelo claro-escuro ambiental, sendo que em ciclos 12h/12h claro/escuro convencionou-se que o ZT0 representa a transição do escuro para o claro (o início do claro) e que o ZT12, a transição do claro para o escuro (o início do escuro), independentemente do horário em que o biotério apaga ou acende suas luzes, como pode ser visto no esquema abaixo.

3.3 Indução de diabetes por estreptozotocina

Dados da literatura reportam que a dosagem de 60 mg/kg de estreptozotocina é usada para indução de diabetes mellitus insulino-dependente (Aksoy, 2003; Cam, 2003; Montilla, 1998). Foi decidido, então, estabelecer a indução de diabetes mellitus insulino-dependente em animais pesando entre 250 e 280g através da injeção de uma única dose de estreptozotocina na concentração de 60 mg/kg.

Os animais foram pesados e a glicemia foi aferida antes do início de cada experimento, conforme ilustrado no esquema acima. A estreptozotocina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) foi preparada em tampão citrato de sódio (NaCl 0,9 g, H₂O destilada 100 mL, citrato de sódio 294 mg) 10mM, pH 4,5 e injetada intraperitonealmente (IP) no período de claro do dia zero de cada experimento. A estreptozotocina foi injetada na concentração de 60 mg/kg de tal forma calculada que nenhum animal recebeu mais do que 580 µL de solução injetada IP. Os animais do grupo controle receberam intraperitonealmente somente o veículo (tampão citrato de sódio) de acordo com seu peso. Os animais não estavam em jejum no momento da indução.

3.4 Aferição da glicemia

A verificação da glicemia foi feita 24 horas após a injeção de estreptozotocina, animais com a glicemia > 200mg/dl foram considerados diabéticos.

O procedimento para aferição da glicemia consistiu em obter uma gota de sangue da ponta da cauda dos animais e pingá-la na tira reagente (Optium Blood Glucose Test Strips, Medisense[®], Bedford, MA, EUA) conectada ao glicosímetro Optium Xceed[®] (Medisense[®]) que afere a glicemia após 5 segundos de análise. O aparelho foi previamente calibrado de acordo com as instruções do fabricante e a cada troca de lote de tiras reagentes. No momento dos sacrifícios, uma gota de sangue também foi coletada do tronco cervical para aferição da glicemia.

3.5 Tratamento com insulina

Os animais diabéticos tratados com insulina receberam subcutaneamente 2U de insulina de liberação lenta (Glargina/Lantus[®] Sanofi-aventis, France) no começo do dia, e no começo da noite receberam 4U de insulina, sendo 2U de insulina regular (Humulin R/Lilly, USA) mais 2U de insulina de liberação lenta (Glargina/Lantus[®] Sanofi-aventis, France), totalizando 6U por dia durante os três dias.

3.6 Aferição da insulinemia

A concentração de insulina nas amostras de soro (obtido por centrifugação a 720 g por 20 minutos à 4 °C, após o sacrifício e em cada ZT) foi determinada por radioimunoensaio. Este método baseia-se na competição entre a insulina marcada com o radioisótopo I¹²⁵ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) e a insulina não-marcada (presente na amostra) pelo anticorpo anti-insulina (1:200) derivado de cobaia. Uma curva-padrão foi preparada utilizando-se concentrações conhecidas de insulina não-marcada (0,2, 0,4, 1, 2, 4 e 8 ng/mL) e a partir desses valores foi possível determinar a concentração de insulina presente nas amostras. O complexo antígeno-anticorpo foi precipitado pela adsorção do hormônio ao polietilenoglicol (PM 6000), sendo uma modificação do método original, (Morgan e Lazarow, 1962; Pupo e Marriero, 1970), que utilizava uma anti-gamaglobulina de cobaia, produzida em coelho, como precipitante. O sobrenadante foi descartado e a contagem da radiação presente no precipitado foi realizada utilizando contador gama (Perkin Elmer[®], Wellesley, MA, EUA).

3.7 Dissociação celular

As retinas foram obtidas de ratos controles e diabéticos sacrificados por decapitação. O tecido foi dissecado e transferido para um tubo contendo a solução de tampão fosfato. O tecido foi incubado durante 20 minutos a 37 °C com 0.25% tripsina-EDTA (Gibco). A digestão enzimática foi inibida com a adição do meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Cultilab, Campinas, SP, Brazil) contendo 10UI/ml de penicilina, 10µg/ml estreptomicina, 10% de soro fetal bovino, 2mM de glutamina e 24mM de glicose. O tecido foi mecanicamente dissociado com o auxílio de uma micropipeta. Os procedimentos de dissociação foram realizados com 6 retinas por grupo.

3.8 Avaliação da viabilidade celular (necrose) e da fragmentação do DNA (apoptose) por citometria de fluxo

As células ressuspensas obtidas pela dissociação foram divididas em triplicata para obtenção de 3 leituras no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Juan, CA, EUA).

Para análise da integridade da membrana celular (viabilidade), foi adicionado às amostras 300µl de salina tamponada (PBS) e 50 µL da solução de iodeto de propídeo (PI) (2 µg/mL). As mesmas foram agitadas suavemente e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. A leitura no citômetro realizou-se imediatamente após a incubação e dez mil eventos

foram adquiridos, em histogramas, por amostra. O PI é um composto fluorescente altamente solúvel em água que não é capaz de atravessar membranas intactas, o que permite identificar células com perda de integridade de membrana. A fluorescência foi determinada no canal FL2 (fluorescência laranja-avermelhada – 585/542 nm).

A quantificação de DNA foi realizada em citometria de fluxo de acordo com o método descrito por Nicolletti et al. (1991). Para análise da fragmentação do DNA foram pipetados 200 µL do tampão de lise contendo iodeto de propídeo (0,1% de citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100 e 2 µg/mL de iodeto de propídeo) nas amostras que foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O PI se liga ao DNA intercalando-se entre as bases e permitindo a detecção da fragmentação do mesmo. A leitura foi realizada imediatamente após o término da incubação, determinando-se a fluorescência através do filtro FL2.

3.9 Pinealectomia

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (45mg/kg) e submetidos à cirurgia de pinealectomia. Os animais foram fixados em aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, California, USA) e o escalpo aberto sagitalmente. Após divulsionamento da musculatura e fâcias que cobrem o crânio na região da sutura lambda, foi feita uma abertura circular usando-se uma broca construída especialmente para esse propósito. A peça óssea foi retirada expondo-se a confluência venosa posterior. Usando uma pinça cirúrgica, foi retirada a glândula pineal situada imediatamente abaixo dos vasos superficiais. Após uma breve hemostasia, o retalho ósseo foi recolocado no lugar e o escalpo foi suturado. Os animais pinealectomizados são denominados Pinx.

3.10 Dosagem de melatonina por HPLC

A concentração de melatonina foi dosada utilizando-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica (HPLC Waters, Milford, MA, EUA). O sistema cromatográfico é composto por uma bomba Waters 610 que perfunde isocraticamente o sistema, uma coluna de fase reversa Resolve C18 (partícula esférica de 5mm; 3,9 x 150mm) e um detector eletroquímico Waters 464, operado em modo DC. O sistema é controlado pelo programa computacional Empower Software (Waters Corporation. v.5.0, 2002) através de uma interface programável (Waters System Interface Module).

As retinas foram sonicadas (Microson XL 2005, Heat System Inc., Farmingdale, NY, EUA) individualmente em 120 µL de uma solução de ácido perclórico 0,1M, EDTA 0,02% e

metabissulfito de sódio 0,02%. Em seguida, foram centrifugadas por 2 minutos a 13.000 g (Eppendorf 5415C Centrifuge, Hamburg, Alemanha) e 40 µL do sobrenadante foram injetados no sistema de cromatografia (injetor modelo 7125, com *loop* de 20 µL, Rheodyne Inc./IDEX[®] Health and Science, Rohnert Park, CA, EUA). Como fase móvel foi usada uma solução contendo tampão acetato de sódio 0,1M, ácido cítrico 0,1M, EDTA 0,15mM e metanol a 35%, pH 3,7. As cromatografias realizadas foram de fase reversa, o sistema foi operado isocraticamente com fluxo de 1 mL/min, potencial de oxidação de +900mV e corrida com 6 minutos de duração.

As soluções-estoque do padrão de melatonina (1mM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) foram preparadas em solução de HCl 0,1M acrescida de EDTA 0,02% e metabissulfito de sódio 0,02%, aliquotadas em tubos de microcentrífuga e mantidas em congelador a -80°C. Na ocasião de sua utilização, uma alíquota do padrão de melatonina foi descongelada e diluída em solução de ácido perclórico 0,1M acrescido de EDTA 0,02% e metabissulfito de sódio 0,02% para obtenção das concentrações desejadas. Todos os reagentes utilizados têm grau de pureza adequado para HPLC.

Curvas de calibração com 5 concentrações diferentes e conhecidas (1,74 a 27,84 ng/20 µL) foram utilizadas para a quantificação da melatonina presente nas amostras. As curvas de calibração foram obtidas através do programa Empower Software (Waters Corporation v.5.0) pela relação das concentrações de cada padrão com as áreas dos picos correspondentes dos cromatogramas. A identificação da melatonina das amostras deu-se pela comparação do seu tempo de retenção com aqueles dos padrões conhecidos e a quantificação foi realizada pelo mesmo programa computacional.

3.11 Análise radiométrica da atividade enzimática

3.11.1 Triptofano hidroxilase (TPH)

O método baseia-se na quantificação do [³H]-5-hidroxitriptofano, que é o produto da reação catalisada pela enzima triptofano hidroxilase (TPH), tendo como precursor o [³H] triptofano. Os reagentes não-radioativos usados nesse ensaio foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Cada retina foi sonicada (Microson XL 2005, Heat System Inc., Farmingdale, NY, USA) em 0,2% de Triton X-100 em tampão fosfato de sódio (2 mM, pH 7, 40 µL). A cada amostra foram acrescentados: HEPES (0,5M, pH 7), catalase (1mg/ml), triptofano (2 mM), dietiltreitol (1M), Fe(NH₄)₂ (SO₄)₂ (1 mM), 6-MPH4 (20 mM) de modo a obter-se,

respectivamente, as seguintes concentrações finais: 50 mM, 100 µg/mL, 50 µM, 5 mM, 10 µM, 500 µM; e 1 µL de [³H] triptofano previamente seco com nitrogênio (1 mCi/mL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA).

O material foi incubado em banho úmido (Microprocessed Controlled Water Baths, Polyscience, Niles, IL, USA) a 37 °C por 10 minutos. Em seguida, foi acrescentada uma solução de carvão ativado (7,5% em 1M HCl, 500 µL) para interromper a reação. As amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5804R Centrifuge, Hamburg, Alemanha) por 2 minutos a 6797 g e o mesmo procedimento foi repetido uma vez. Em seguida, 200 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos de contagem e foram acrescentados 4 mL do líquido de cintilação (Optiphase HiSafe 3, PerkinElmer Inc., Wellesley, MA, EUA) para amostras aquosas.

As amostras, tubos de “branco” (mistura dos reagentes, com exceção do homogenato) e de “padrão” (tampão, mix de reação e 1M HCl sem o carvão ativado) seguiram para contagem da radioatividade em contador β (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Os resultados foram expressos em picomoles de produto formado por retina por hora.

3.11.2 Arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT)

O método baseia-se na quantificação da N-[³H]-acetiltriptamina que é o produto da reação da [³H] acetil-coenzima A ([³H] acetil CoA) e da triptamina, catalizada pela enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase. O produto marcado foi extraído em clorofórmio e sua radioatividade foi medida (método desenvolvido por Parfitt et al., 1975, modificado a partir do método de Deguchi e Axelrod, 1972).

Os procedimentos consistiram em adicionar aos tubos de microcentrífuga contendo uma retina: 25 µL de triptamina (40 mM) e 25 µL de tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 6,8), a 4 °C. As retinas foram então sonicadas (Microson XL 2005, Heat System Inc., Farmingdale, NY, USA) com um pulso de 30 segundos para completa destruição do tecido. Em seguida foram adicionados 25 µL de [³H] acetilCoA (2mM, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) e novamente 25µL de tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 6,8), a 4 °C.

As amostras foram agitadas e incubadas em banho seco (Eppendorf Thermomixer, Hamburg, Alemanha) com agitação de 650 rpm, a 37 °C, por 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1mL de clorofórmio saturado com tampão fosfato a cada uma das amostras e o produto foi extraído agitando-se os tubos por 1 minuto. Para a separação

completa das fases aquosas e lipossolúveis as amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5804R Centrifuge, Hamburg, Alemanha) por 40 segundos, a 14.000 rpm, a 4 °C.

As fases aquosas foram removidas e 200 µL do clorofórmio saturado com tampão fosfato foram acrescentados. Novamente as amostras foram agitadas, centrifugadas e as fases aquosas removidas. Para finalizar, 500 µL do clorofórmio contendo o produto da reação (³H-N-acetilriptamina) foram transferidos para os tubos de contagem e evaporados até que as amostras ficassem completamente secas. O líquido de cintilação (3 mL, BCS-NA non-aqueous biodegradable counting scintillant, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) foi acrescentado e a radioatividade de amostras e tubos de “branco” (mistura dos reagentes, com exceção do homogenato) foi medida em contador β (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Os resultados foram expressos em picomoles de produto formado por retina por hora.

Os reagentes não-radioativos usados nesse ensaio foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

3.12 Quantificação do AMP cíclico

O conteúdo de AMPc das retinas foi quantificado por ELISA usando o *cAMP direct immunoassay kit* (BioVision, Mountain View, CA, EUA). Na preparação das amostras cada retina foi homogeneizada em 100µL de HCL 0.1M, centrifugada por 5 minutos e o sobrenadante coletado. A partir desse ponto os procedimentos foram feitos de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente o kit baseia-se em um ensaio de competição, sendo que a placa fornecida apresenta o anticorpo policlonal anti-AMPc ancorado através da proteína G recombinante. O AMPc conjugado com peroxidase de raiz forte (cAMP-HRP) compete diretamente com o AMPc oriundo das amostras pela ligação no anticorpo presente na placa. Após períodos de incubação e procedimentos de lavagens, adicionou-se o substrato colorimétrico da HRP tornando possível a quantificação do montante de cAMP-HRP ligado na placa. A leitura foi feita no comprimento de onda de 450nm, sendo a intensidade inversamente proporcional a concentração de AMPc proveniente da amostra. Uma curva padrão com quantidades conhecidas de AMPc foi feita para possibilitar a quantificação das amostras e os resultados foram expressos em pmol/retina.

3.13 Extração de RNA total

Para extração do RNA total, cada retina foi homogeneizada com ajuda de um pistilo em 1 mL de Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A extração foi feita de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, a mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente e acrescida de 200 µL de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA) para desproteínização. O sobrenadante foi separado por centrifugação (Eppendorf 5804R Centrifuge, Hamburg, Alemanha), 12.000 g, 15 minutos, à 4 °C e o RNA contido na fase aquosa foi transferido para outro tubo e precipitado com 500 µL de isopropanol (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA) e 1 µg de glicogênio (Roche Applied Science, Indianápolis, IN, EUA).

Após incubação à -20 °C por até 24 horas, as amostras foram centrifugadas (12.000 g, 10 minutos, 4 °C) para formação do precipitado e o sobrenadante foi descartado. O RNA total precipitado foi lavado com 1 mL de etanol (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA) 75% e ressuspenso em 15 µL de H₂O deionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

Antes de sua utilização, cada amostra foi quantificada e analisada, quanto à pureza e integridade, por espectrofotometria utilizando o aparelho NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) que analisa 2 µL da amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm e determina a sua concentração em ng/µL, além da razão 260/280 que é um indicativo da qualidade do RNA extraído. Amostras com razão 260/280 acima de 1,80 foram utilizadas nos procedimentos subsequentes. As amostras foram mantidas à -80 °C para posterior síntese de cDNA.

3.14 Obtenção de cDNA

Amostras de 5 µg de RNA total foram submetidas à reação de transcrição reversa com primers randômicos. Para isto foi adicionado a cada amostra: tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂), DTT (10 mM), mistura de dNTPs (10mM cada), primers randômicos (150ng) e a enzima SuperScript III (200U; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), em volume final de 20 µL. As reações foram incubadas no termociclador MyGene™ Series Gradient (LongGene®, China) por 5 minutos à 65 °C, seguida de 10 minutos à 25 °C, com aquecimento para 42 °C por 75 minutos e 70 °C por 15 minutos para desnaturação da enzima. As amostras de cDNA foram armazenadas à -20 °C.

3.15 Análise quantitativa da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

A análise quantitativa da expressão gênica foi realizada através da técnica de PCR em tempo real utilizando o aparelho 7500 Real-Time PCR System® (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata utilizando 2 µL de cDNA (20ng) previamente sintetizado, adicionado à mistura da reação contendo 12,5 µL de *Power SYBR*® Green (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), 8,5 µL de água MilliQ e 400 nM dos primers específicos para cada gene.

Os primers usados foram desenhados de modo que sua localização lhes desse a característica de flanquearem um íntron (*intron-spanning*), o que impossibilita a amplificação de DNA genômico. A eficiência dos pares de primers foi testada e determinada por reação de PCR em tempo real utilizando diluições (10^7 a 10^2 cópias) dos respectivos fragmentos clonados, nas mesmas condições e com o mesmo aparelho usado para todas as reações subsequentes. A determinação da eficiência se deu pela análise de regressão linear feita utilizando o software 7500 versão 2.0.3 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Todos os pares de primers usados foram considerados adequados quando apresentaram eficiência entre 1,8 e 2,0.

Os primers, número de acesso no GenBank™ (NCBI – NIH, Bethesda, EUA), seqüências do sense e do antisense, tamanho dos fragmentos amplificados e a localização estão listados no Quadro 1.

Os parâmetros de amplificação foram os seguintes: 1) etapa inicial de ativação da enzima a 50 °C por 1 minuto e 95 °C por 10 minutos, 2) 40 ciclos que incluíram a desnaturação a 95 °C por 15 segundos; o anelamento dos primers e a extensão a 60 °C por 1 minuto (temperatura ótima para todos os pares de primers usados) 3) 1 ciclo para análise do *melting* que consistiu em 95 °C por 15 segundos; 60 °C por 1 minuto e posterior aumento gradativo da temperatura para 95 °C para obtenção das curvas de *melting*.

O limiar para desconsideração do ruído na fluorescência de cada amostra foi determinado automaticamente pelo software 7500 versão 2.0.3 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), que também determinou as curvas de *melting* além de quantificar o número de cópias de cada gene utilizando o método de derivação secundária.

Quadro 1. Sequência dos primers utilizados

Primer	Nº Acesso	Sequências	Fragmento	Localização
Triptofano-hidroxilase 1 (Tph1)	NM_001100634	5'-CTCTTGGAGCTTCAGAGGAGAC-3' 5'-GACTCTCAGCTGCCCCATCTTG-3'	98bp	964 - 1062
Anil-alquil-N-acetiltransferase (Aanat)	NM_012818	5'-AAAGTACACTCAGGCACCAATGT-3' 5'-GGGAACATAGCTGCTTTATTAGTGTCAG-3'	110bp	1202 - 1312
Hidroindol-oxi-metiltransferase (Asmt/Hiomt)	NM_144759.2	5'-TGCCCCGACCCACTTCCTGTC-3' 5'-GACCCGGGCAAGAATGAAGAG-3'	112bp	89 - 201
Glut1 (Slc2a1)	NM_138827.1	5'-ACCCTGCATCTCATTGGTCT-3' 5'-GGCCACGATCTCAGATAGGAC-3'	111bp	1211 - 1321
Receptor de insulina (Insr)	NM_017071	5'-CAGCCTGATTATCAACATCCGAGG-3' 5'-ACGGATCTTTAGGAACCCGAGA-3'	100bp	1439 - 1539
Adenilato ciclase 1 (Adcy1)	NM_001107239.1	5' - TGCGGCTGGAAGATGAGAA -3' 5' - TCATCTCCATGGCGACATTC -3'	77bp	302 - 279
Bmal 1 (Arntl)	NM_024362.2	5' - CCGATGACGAACCTGAAACACC -3' 5' - TCTTCCTCGGTACATCCT -3'	77bp	428 - 505
Beta actina (Actb)	NM_031144	5'-CTAGGAGCCAGGGCAGTAATCT-3' 5'-AAGACCTCTATGCCAACACAGTG-3'	97bp	117 - 214
Proteína ribossomal L37a (Rpl37a)	NM_001108801	5'-CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTG-3' 5'-GCCACTGTTTCATGCAGGAAC-3'	93bp	161 - 254
Gama actina 1 (Actg1)	NM_001127449	5'-TACCCTATTGAGCACGGCAT-3' 5'-CGCAGCTCGTTGTAGAAGGT-3'	80bp	279 - 358

Esse método consiste em determinar o número de cópias de cada gene pela comparação entre o valor de amplificação (*cycle threshold* e curva de amplificação) de cada amostra, com a curva de padrões composta de diluições de plasmídeos recombinantes que contêm cópias clonadas dos genes de interesse e constitutivos (10^7 a 10^2 cópias). Os procedimentos de clonagem e obtenção dos padrões estão descritos a seguir.

Após a determinação do número de cópias de cada gene, o valor obtido para os genes de interesse foi normalizado pela média geométrica dos 3 genes constitutivos usados (Beta actina, Rpl37a e Gama actina).

3.16 Clonagem e obtenção dos padrões

A obtenção dos fragmentos amplificados para cada gene de interesse e para os constitutivos foi feita utilizando os pares de primers citados acima, nas mesmas condições de ciclagem e com o mesmo aparelho 7500 Real-Time PCR System[®] (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Como descrito no item anterior, os ensaios foram realizados em duplicata utilizando 2 µL de cDNA (20ng) de retina previamente sintetizado, adicionado à mistura da reação contendo 12,5 µL de Power SYBR Green mix (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), 8,5 µL de água MilliQ e 400 nM dos primers específicos para cada gene.

Após a amplificação, procedeu-se a eletroforese em gel de agarose 1,2% (Sigma Biochemical CO, St. Louis, EUA) e os pares de primers que apresentaram somente um

fragmento amplificado no tamanho esperado foram escolhidos para serem usados nas reações subsequentes. Os procedimentos de clonagem foram feitos individualmente para cada fragmento.

O passo seguinte foi o da ligação do fragmento amplificado ao vetor pGEM-T easy (Figura 6, Promega Corporation, Madison, WI, EUA) que foi feita adicionando 3 μ L da reação de PCR que mostrou somente um fragmento amplificado à 5 μ L do tampão de ligação, 0,5 μ L do vetor pGEM-T easy e 1 μ L da enzima T4 DNA ligase. A reação foi gentilmente misturada e incubada a temperatura ambiente por 1 hora.

Figura 6. Mapa do vetor pGEM-T easy mostrando o sítio de inserção do fragmento, com os diversos posicionamentos dos sítios de restrição para várias enzimas e a localização dos dois promotores para início da transcrição.

Com o fragmento inserido no vetor, a transformação de bactérias *E. coli* competentes foi feita adicionando 2 μ L da ligação à 25 μ L de bactérias TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A reação foi incubada em gelo por 20 minutos, seguidos de 50 segundos a 42 °C e de 2 minutos novamente no gelo. Esse procedimento de transformação é conhecido como *heat-shock*. As bactérias transformadas foram adicionadas a 200 μ L de meio SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubadas a 37 °C por 1 hora, com agitação plana de 225 rpm.

As bactérias foram então semeadas em placas de cultura com meio LB (Luria Bertani) Agar adicionado de 50 μ g/ml de ampicilina (KD Medical, Inc., Columbia, MD, EUA), 100 μ L de IPTG (isopropil-B-D-tiogalactosídeo) e 20 μ L de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoilo-B-D-galactosídeo), ambos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 12 horas.

Devido à aplicação de IPTG e X-gal, pôde-se realizar a seleção das colônias bacterianas que possuíam o inserto de interesse. Colônias azuis não continham inserto, possuindo vetores intactos que puderam expressar β -galactosidase ativa capaz de reagir com X-gal e resultar na coloração azul. Colônias brancas por sua vez apresentavam o inserto que interrompeu a sequência codificadora da β -galactosidase (Sambrook e Russel, 2001).

Após incubação, 4 colônias brancas de cada fragmento foram adicionadas individualmente a tubos contendo 2 mL de meio LB (Luria Bertani, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) acrescidos de 2 μ L de ampicilina (1 mg/mL, Sigma Biochemical CO, St. Louis, MO, EUA). As culturas líquidas foram incubadas a 37 °C por 12 horas, com agitação plana de 225 rpm.

As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos para formação do precipitado de bactérias, o sobrenadante foi descartado e a obtenção de *mini-prep* foi feita utilizando o kit QIAprep® Miniprep (Qiagen, Germantown, MD, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. As preparações tiveram suas concentrações aferidas pelo aparelho NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

O material genético das bactérias recombinantes obtido pela preparação de *mini-prep* foi submetido à análise de restrição com a enzima EcoRI (Fermentas Life Sciences, Burlington, Oregon, Canadá) e posterior eletroforese em gel de agarose 1,2% (Sigma Biochemical CO, St. Louis, EUA) para confirmação da presença do fragmento de interesse. As preparações que se evidenciaram positivas para presença do fragmento foram enviadas para sequenciamento utilizando os serviços da empresa MacroGen USA (Rockville, MD, EUA).

As sequências recebidas foram analisadas utilizando o *software* BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EUA) e comparadas à base de dados de nucleotídeos Entrez Nucleotide (NCBI – NIH, Bethesda, EUA) para análise da localização cromossômica e similaridade com a sequência genômica para os respectivos genes. Os fragmentos clonados foram considerados adequados para uso como padrão, nas reações de PCR em tempo real, quando apresentaram igualdade às sequências descritas para aqueles genes na referida base de dados.

A obtenção de 10^9 cópias dos fragmentos clonados foi feita através de cálculos matemáticos utilizando a concentração e tamanho dos plasmídeos, o tamanho dos fragmentos clonados e o número de Avogrado. Diluições seriadas (10^7 a 10^2 cópias) foram feitas em água MilliQ imediatamente antes de cada reação de PCR em tempo real. Cada diluição foi pipetada

em duplicata e passou pelos mesmos procedimentos descritos para as amostras. Tanto amostras quanto diluições para curva padrão foram sempre amplificadas no mesmo bloco de reações.

3.17 Análise estatística

As análises estatísticas, escolhidas de acordo com o desenho experimental, foram realizadas utilizando-se o programa computacional Prism v 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Todos os resultados estão representados como média $\pm$ SEM. ANOVA unifatorial seguida de Bonferroni foi utilizado na análise da glicemia. ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni foi utilizado nas análises da insulinemia, conteúdo de melatonina circadiana, atividades enzimáticas e expressões gênicas. Teste t de Student bicaudal não pareado foi utilizado nas análises de viabilidade, fragmentação e conteúdo de melatonina retiniana dos grupos controles e Pinx.

Os testes usados para cada grupo de dados e as respectivas significâncias estatísticas estão descritos na legenda de cada gráfico.

4 RESULTADOS

4.1 Aferição da glicemia e insulinemia

Conforme descrito anteriormente, a glicemia dos animais foi aferida no decorrer do sacrifício ao longo das 24 horas. Portanto os dados representam a média de todos os ZTs. Animais de todos os grupos receberam água e comida à vontade.

O grupo controle mostrou níveis glicêmicos normais (por volta de 100 mg/dL). A condição diabética dos animais foi bem estabelecida como pode ser visto pelo alto índice glicêmico do grupo diabético. O tratamento com insulina foi satisfatório na prevenção da hiperglicemia do grupo diabético tratado, mantendo a glicemia no mesmo nível do grupo controle (Figura 7).

Figura 7. Glicemia dos grupos controle, diabético e diabético tratado com insulina 3 dias pós-indução, no momento do sacrifício (n=27/grupo). ANOVA unifatorial seguida de Bonferroni com *** $p < 0,0001$ vs controle e vs diabético + insulina. Não há diferença estatística entre o grupo controle vs diabético + insulina. Média $\pm$ EPM.

Além da aferição da glicemia, realizamos também a dosagem da concentração de insulina (que se deu no soro coletado dos animais no decorrer do sacrifício, conforme anteriormente citado) para melhor avaliação do quadro diabético. Em cada grupo, e em cada ZT, soros de 6 animais foram dosados (Figura 8).

Figura 8. Perfis diários da insulinemia dos animais controles e diabéticos 3 dias pós-indução (n=6 para cada grupo em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p < 0,0001$ para o fator tratamento; $p < 0,0001$ para o fator ZT e $p < 0,0001$ para a interação tratamento vs ZT. * $p < 0,0001$ vs controle. Média $\pm$ EPM.

A figura 8 representa a variação diária na insulinemia dos animais controles, com um aumento no ZT18 logo após o período de surto de alimentação dos animais. Já o grupo diabético não apresentou o aumento no ZT18, além de ter níveis basais mais baixos em relação ao controle. Esse perfil mostra uma desorganização na capacidade desses animais em responder ao pico de glicemia resultante da alimentação no período de escuro.

4.2 Avaliação da viabilidade celular e da fragmentação do DNA

Para avaliar a condição das retinas, 3 dias após a indução do diabetes pela estreptozotocina, foi usada a técnica de citometria de fluxo descrita anteriormente. A figura 9 representa a viabilidade celular e mostra que 80% das células estavam íntegras tanto no grupo controle como no grupo diabético. A análise estatística mostra que não há diferença entre os grupos, portanto 3 dias na condição diabética não causou necrose nas células da retina.

Figura 9. Viabilidade celular dos grupos controle e diabético 3 dias pós-indução (grupo controle n=10, grupo diabético n=6). Teste t de Student, bicaudal não pareado com $p = 0.7688$. Média $\pm$ EPM.

A figura 10 representa a porcentagem de células com o DNA fragmentado, ou seja, células em apoptose. No grupo controle 20% das células estavam em apoptose, enquanto que no grupo diabético aproximadamente 17% das células se encontravam em apoptose. Novamente, a análise estatística mostra que não há diferença entre os grupos controle e diabético e, portanto, 3 dias na condição diabética não causou apoptose nas células da retina.

Figura 10. Porcentagem de células com DNA fragmentado nas amostras dos grupos controle e diabético 3 dias pós-indução (grupo controle n=10, grupo diabético n=6). Teste t de Student, bicaudal não pareado com $p = 0.2732$. Média $\pm$ EPM.

Tanto a avaliação da viabilidade celular como da fragmentação do DNA mostraram que com apenas 3 dias de diabetes a hiperglicemia não foi capaz de causar danos celulares no tecido retiniano.

4.3 Dosagem de melatonina

4.3.1 Perfil diário da melatonina retiniana após 3 dias de diabetes induzido por estreptozotocina

Como esperado, a dosagem de melatonina nas retinas do grupo controle mostrou um claro ritmo circadiano com altos níveis durante o período escuro e baixos níveis durante o período claro. Nas retinas do grupo diabético o nível de melatonina foi menor tanto no ZT18 ($p < 0.01$) como no ZT21 ($p < 0.05$) quando comparados com o grupo controle e o grupo diabético tratado com insulina. Não há diferença estatística na entre o grupo controle e o grupo diabético tratado com insulina (Figura 11)

Figura 11. Perfis diários da produção de melatonina retiniana dos grupos controle, diabético e diabético tratado com insulina 3 dias pós-indução (n=12 para os grupos controle e diabético, n=3 para o grupo Diabético + Insulina em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,0072$ para o fator tratamento; $p < 0,0001$ para o fator ZT e $p = 0,0042$ para a interação tratamento vs ZT. ** $p < 0,001$ vs ZT18 diabético e * $p < 0,05$ vs ZT15 diabético. Média $\pm$ EPM.

Assim como ocorre na glândula pineal, a síntese de melatonina retiniana está reduzida no grupo de animais diabéticos. Essa redução foi evitada, mantendo os mesmos valores do grupo controle, quando o grupo diabético teve sua glicemia restabelecida com a reposição de insulina.

4.3.2 Quantidade de melatonina retiniana de animais pinealectomizados (Pinx) e animais intactos (controles)

Para determinar se a melatonina circulante, proveniente da glândula pineal, contribui com a quantidade de melatonina encontrada na retina, foi feita a cirurgia de retirada da glândula pineal e posterior dosagem de melatonina da retina por HPLC.

A figura 12 mostra a quantidade de melatonina proveniente da retina tanto de animais intactos (controles) quanto de animais Pinx. Como a melatonina é sintetizada exclusivamente no período noturno, as retinas desse experimento foram coletadas somente nos pontos do escuro (ZTs 15, 18, 21 e 24).

Figura 12. Quantidade de melatonina retiniana dos grupos controle e Pinx. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM do período noturno (ZTs 15,18, 21 e 24), 30 dias pós-cirurgia (n= 16 para cada grupo). Teste t de Student, bicaudal não pareado com $p = 0,8198$. Média $\pm$ EPM.

De acordo com a figura 12 não há diferença estatística na quantidade de melatonina retiniana entre os grupos controle e Pinx. Isso mostra que a melatonina circulante, oriunda da glândula pineal, não colabora com a quantidade de melatonina encontrada na retina.

4.4 Atividade Enzimática

4.4.1 Perfil de atividade da enzima AANAT retiniana após 3 dias de diabetes induzido por estreptozotocina

No intuito de descobrir o porquê da diminuição na quantidade de melatonina nas retinas do grupo diabético, analisou-se a atividade da enzima chave na via de síntese de melatonina.

A atividade da enzima AANAT no grupo controle possui um claro ritmo circadiano, e quando comparado com o grupo diabético o grupo controle apresentou alta atividade no

período noturno, com pico no ZT15 ($p < 0.01$), e baixa atividade no período claro especialmente no ZT6 ($p < 0.01$). O grupo diabético perdeu o ritmo circadiano de atividade presente no grupo controle. O tratamento com insulina evitou a perda do ritmo circadiano observado no grupo diabético, porém houve um atraso de fase no pico de atividade, ZT18 ($p < 0.05$), quando comparado com o grupo controle (Figura 13).

Figura 13. Perfis diários da atividade da enzima AANAT retiniana dos grupos controle, diabético e diabético tratado com insulina 3 dias pós-indução (n=12 para os grupos controle e diabético, n=3 para o grupo Diabético + Insulina em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,4360$ para o fator tratamento; $p < 0,0001$ para o fator ZT e $p = 0,0001$ para a interação tratamento x ZT. ** $p < 0,01$ vs diabético ZT15 e vs controle ZT6 e * $p < 0,05$ vs controle e diabético. Média $\pm$ EPM.

4.4.2 Perfil de atividade da enzima TPH retiniana após 3 dias de diabetes induzido por estreptozotocina

Diferentemente da enzima AANAT, a análise radiométrica da atividade da enzima TPH no grupo controle mostrou que não há uma variação circadiana nesse parâmetro. O mesmo padrão de atividade foi observado no grupo diabético. Portanto, não há diferença, atestada pela ANOVA, entre os valores observados para os grupos controle e diabético (Figura 14).

Figura 14. Perfis diários da atividade da enzima TPH retiniana dos grupos controle e diabético 3 dias pós-indução (n= 5 para os grupos controle e diabético em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,3815$ para o fator tratamento; $p = 0,4358$ para o fator ZT e $p = 0,7586$ para a interação tratamento vs ZT. Média $\pm$ EPM.

4.5 Quantificação do AMP cíclico

Sabendo que a transcrição e estabilidade da enzima AANAT são alvos do controle fótico através da ativação da via do AMPc que ocorre com a despolarização da camada fotorreceptora no período de escuro, e a tentativa de entender o porquê da diminuição da atividade desta enzima, foi feita a quantificação do conteúdo de AMPc presente nas retinas dos grupos controle e diabético (Figura15). Como pode ser observado há, em ambos os grupos, um aumento no conteúdo deste segundo mensageiro no período de escuro. No caso do grupo controle esse aumento começa no final do dia (ZT9) e atinge o pico no ZT 15. Já no grupo diabético existe um aumento no ZT9 que perdura constante durante o resto da noite. A análise estatística (ANOVA) mostrou diferenças no ZT6 ($p < 0.01$) e ZT15 ($p < 0.05$) entre os grupos controle vs diabético.

Figura 15. Perfis diários da quantidade de AMPc em retinas dos grupos controle e diabético 3 dias pós-indução (n= 3 para os grupos controle e diabético em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p < 0,05$ para o fator tratamento; $p < 0,0001$ para o fator ZT e $p < 0,05$ para a interação tratamento vs ZT. ** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ vs controle. Média $\pm$ EPM.

4.6 Expressão gênica

4.6.1 Aanat

A figura 16 mostra o perfil diário da expressão gênica da enzima passo limitante na síntese de melatonina, a AANAT. Como pode ser visto, tanto no grupo controle como no grupo diabético houve um aumento significativo de expressão gênica no período de escuro. No caso do grupo controle esse aumento é diretamente relacionado ao perfil de atividade da AANAT e a síntese de melatonina. A análise estatística (ANOVA) mostrou diferença no ZT18 ($p < 0,05$) entre os grupos controle vs diabético.

Figura 16. Perfis diários da expressão do RNAm da enzima AANAT retiniana dos grupos controle e diabético 3 dias pós-indução ($n=3$ para os grupos controle e diabético em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,3815$ para o fator tratamento; $p = 0,4358$ para o fator ZT e $p = 0,7586$ para a interação tratamento vs ZT. * $p < 0.05$ vs controle ZT18. Média $\pm$ EPM.

4.6.2 Tph

A figura 17 mostra o perfil diário da expressão gênica da enzima TPH. Observa-se uma flutuação mais acentuada do grupo controle em relação ao grupo diabético ao longo das 24 horas. A análise estatística (ANOVA) mostrou diferença no ZT9 ($p < 0.01$) entre os grupos controle vs diabético.

Figura 17. Perfis diários da expressão do RNAm da enzima TPH retiniana dos grupos controle e diabético 3 dias pós-indução ($n=3$ para os grupos controle e diabético em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,5399$ para o fator tratamento; $p = 0,1899$ para o fator ZT e $p = 0,0310$ para a interação tratamento vs ZT. ** $p < 0.01$ vs controle. Média $\pm$ EPM.

4.6.3 *Hiomt*

A figura 18 representa o perfil diário da expressão gênica da enzima HIOMT. Tanto no grupo controle como no grupo diabético foi encontrada uma variação ao longo das 24 horas, com pico de expressão no período claro (ZT6). Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos controle e diabético.

Figura 18. Perfis diários da expressão do RNAm da enzima HIOMT retiniana dos grupos controle e diabético 3 dias pós-indução ($n=3$ para os grupos controle e diabético em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p=0,0392$ para o fator tratamento; $p<0,0001$ para o fator ZT e $p=0,5040$ para a interação tratamento vs ZT. Média $\pm$ EPM.

4.6.3 *Adenilato ciclase 1 (AC1)*

A figura 19 representa o perfil diário da expressão gênica da enzima adenilato ciclase 1. No grupo controle observa-se um pico de expressão no meio do dia (ZT6) e um segundo pico na transição do dia para noite (ZT12) que diminui gradualmente até chegar ao nível basal no ZT21 aumentando novamente no ZT24. No grupo diabético ocorre a perda do perfil observado no grupo controle havendo um aumento no ZT6 que perdura até o ZT15, sendo a amplitude dessa variação muito menor da encontrada no grupo controle. A análise estatística (ANOVA) mostrou diferenças no ZT9 ($p<0,01$) e ZT21 ($p<0,05$) entre os grupos controle vs diabético.

Figura 19. Perfis diários da expressão do RNAm da enzima AC1 retiniana dos grupos controle e diabético 3 dias pós-indução (n= 3 para os grupos controle e diabético em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p < 0,05$ para o fator tratamento; $p < 0,0001$ para o fator ZT e $p < 0,05$ para a interação tratamento vs ZT. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ vs controle. Média $\pm$ EPM.

4.6.4 *Bmal1*

A figura 20 representa o perfil diário da expressão do RNA mensageiro do gene relógio *Bmal1*. No grupo controle observa-se um pico de expressão no meio do dia (ZT6) e um segundo pico na transição do dia para noite (ZT12) que se mantém até chegar ao nível basal no ZT21 aumentando novamente no ZT24. No grupo diabético ocorre a perda do perfil de expressão observada no grupo controle, não havendo variação ao longo das 24 horas. A análise estatística (ANOVA) mostrou diferenças no ZT9 ($p < 0,01$) e ZT21 ($p < 0,01$) entre os grupos controle vs diabético.

Figura 20. Perfis diários da expressão do RNAm do gene relógio Bmal1 em retinas dos grupos controle e diabético 3 dias pós-indução (n= 3 para os grupos controle e diabético em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p < 0,05$ para o fator tratamento; $p < 0,0001$ para o fator ZT e $p < 0,05$ para a interação tratamento vs ZT. ** $p < 0,01$ vs controle. Média $\pm$ EPM.

4.6.5 Receptor de Insulina (*Insr*)

A figura 21 representa o perfil diário da expressão gênica do receptor de insulina nos grupos controle e diabético. Como esperado apenas 3 dias de diabetes não foram suficientes para alterar a expressão do receptor de insulina na retina, não há diferença estatística entre o grupo controle e o grupo diabético.

Figura 21. Perfis diários da expressão do RNAm do receptor de insulina (Insr) na retina dos grupos controle e diabético 3 dias pós-indução (n= 3 para os grupos controle e diabético em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,5286$ para o fator tratamento; $p = 0,0006$ para o fator ZT e $p = 0,6243$ para a interação tratamento vs ZT. Média $\pm$ EPM.

4.6.6 *Glut1*

A figura 22 representa o perfil diário da expressão gênica do transportador de glicose GLUT1 na retina. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos controle e diabético, e em ambos os grupos houve um aumento na expressão do GLUT1 no final do período de escuro.

Figura 22. Perfis diários da expressão do RNAm do transportador de glicose (GLUT1) na retina dos grupos controle e diabético 3 dias pós-indução (n= 3 para os grupos controle e diabético em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,2307$ para o fator tratamento; $p = 0,0003$ para o fator ZT e $p = 0,4600$ para a interação tratamento vs ZT. Média $\pm$ EPM.

5 DISCUSSÃO

Diversos estudos mostraram o efeito protetor da melatonina em retinas de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina (Calantuani et al., 2002; Baydas et al., 2004; Gul et al., 2008). O presente trabalho é pioneiro em mostrar o efeito do quadro diabético, induzido por STZ, na síntese de melatonina retiniana.

Inicialmente, o quadro diabético experimental foi satisfatoriamente atingido. Os animais do grupo diabético tornaram-se hiperglicêmicos e insulinopênicos. Por outro lado, o tratamento com insulina foi suficiente na prevenção da hiperglicemia do grupo diabético tratado mantendo o valor glicêmico semelhante ao do grupo controle.

Com o objetivo de excluir qualquer tipo de dano que a droga, STZ, pudesse causar na retina e comprometer os resultados, já que ela age metilando o DNA resultando em sua fragmentação, foram feitos controles de viabilidade celular (necrose) e fragmentação de DNA (apoptose) como já descritos.

O gráfico de viabilidade celular mostra que não há diferença no número de células íntegras entre o grupo controle e o grupo diabético, ambos os grupos possuem cerca de 80% de células íntegras. O valor de 20% de células que não estão íntegras, em ambos os grupos, é, provavelmente, decorrente da técnica de dissociação celular onde há a destruição enzimática e mecânica do tecido.

O mesmo resultado pode ser verificado no gráfico de fragmentação de DNA, onde 20% das células estão com DNA fragmentado não havendo diferença estatística entre o grupo controle e o grupo diabético. Tanto o número das células que estão em necrose quanto o número das células que estão em apoptose coincide em torno dos 20%, corroborando com o fato de esses valores serem decorrentes da técnica de dissociação.

Com esses resultados pode-se concluir que a droga não causou danos celulares nas retinas dos animais diabéticos, aos 3 dias de evolução da doença.

Além disso, Park et al. (2003) mostraram que a retina de ratos diabéticos, induzidos por STZ, apresenta mudanças degenerativas nos processos pós-sinápticos das células horizontais à partir de uma semana da indução do quadro diabético. Com quatro semanas do quadro diabético notaram-se processos apoptóticos na camada fotorreceptora, a camada onde a melatonina é sintetizada.

Portanto, com esses dados e os acima mencionados pode-se excluir qualquer tipo de alteração morfológica ou lesão celular, decorrentes dos 3 dias de diabetes, que pudessem explicar os resultados demonstrados da redução do conteúdo de melatonina retiniana.

Assim como já mostrado por Tosini e Menaker (1998) a dosagem de melatonina das retinas do grupo controle apresenta um ritmo diário com pico no ZT18. Por outro lado, nas retinas do grupo diabético a quantidade de melatonina foi 40% menor no período de escuro quando comparado ao grupo controle. E quando os animais diabéticos foram tratados com insulina, a quantidade e o perfil de melatonina foram restabelecidos.

Não há na literatura dados sobre a quantidade e o perfil de melatonina na retina de ratos diabéticos, o pouco que se tem conhecimento é sobre a quantidade da melatonina pineal e/ou plasmática.

De acordo com os resultados obtidos na retina, outros autores também descreveram, na glândula pineal, uma diminuição relevante na síntese de melatonina em animais diabéticos induzidos por aloxana ou STZ tanto em ratos (Pang et al., 1985; Stebelová et al., 2007) quanto em hamsters (Champney et al., 1983, 1986). Controversamente, outros 2 artigos mostraram que não há alteração no conteúdo da melatonina pineal em ratos diabéticos induzidos por STZ (Champney et al., 1986; Herichová et al., 2005). Essa discrepância nos resultados pode, provavelmente, ser decorrente de diferenças no período de coleta, já que não foram coletados todos os pontos do escuro.

Já a melatonina plasmática, dados de Stebelová et al. (2007) indicam não haver alteração no conteúdo plasmático do referido indol em ratos Wistar diabéticos por STZ 17 dias pós-indução. Peschke et al. (2008) mostrou aumento na concentração plasmática de animais diabéticos tipo 1, 6 semanas pós-indução com STZ.

Importantemente, a diminuição no conteúdo plasmático de melatonina foi encontrada em humanos tanto com diabetes tipo 1 (O'Brien et al., 1986; Tutuncu et al., 2005) quanto com diabetes tipo 2, bem como em ratos com o mesmo tipo de diabetes (Peschke et al., 2006).

Com os dados acima e a especulação de que a melatonina de origem pineal, circulante, pudesse de certa forma influenciar a dosagem da melatonina retiniana, fez-se um experimento dedicado a dosar a melatonina retiniana em animais pinealectomizados comparados com animais controles. Os resultados demonstraram que não há diferença na quantidade de melatonina das retinas do grupo controle em relação ao grupo Pinx.

Esse dado, demonstrando que a melatonina dosada na retina é exclusivamente de origem retiniana, exclui qualquer possibilidade de que a redução da melatonina pineal e

circulante, decorrente da indução do diabetes químico, pudesse ser o determinante da redução na quantidade de melatonina retiniana aqui demonstrada. Ou seja, a redução da melatonina retiniana deve-se à alterações dos mecanismos intrínsecos de síntese de melatonina na retina. Para isso, resolvemos investigar as enzimas envolvidas nesta via. A primeira analisada foi a enzima passo limitante, a AANAT.

O grupo controle apresentou um ritmo diário com maior atividade no período de escuro e com pico no ZT15. Niki et al. (1998) já haviam mostrado o mesmo perfil de atividade na retina de ratos Wistar.

Em concordância com o resultado que mostra a redução da síntese de melatonina, a atividade da enzima AANAT foi consideravelmente menor no grupo diabético, indicando um possível efeito causal na diminuição da melatonina observada neste grupo. Além disso, o perfil circadiano da atividade observado no grupo controle é perdido no grupo diabético. Assim, a clara falta da insulina e/ou a hiperglicemia provocaram tanto a diminuição da síntese de melatonina quanto da atividade da AANAT nas retinas.

O grupo diabético tratado com insulina teve seu perfil de atividade diária preservada como no grupo controle, porém é observado um atraso de fase de 3 horas no pico de atividade da enzima AANAT. Enquanto o grupo controle tem o pico de atividade no ZT15, o grupo diabético tratado com insulina tem o pico de atividade no ZT18. Isso se deve, provavelmente, a uma sincronização ou mascaramento do ritmo pela injeção de insulina que foi aplicada no começo do dia e no começo da noite. Lynch et al. (1973) mostraram que a insulina foi capaz de aumentar a atividade da enzima AANAT pineal e o nível plasmático de melatonina, assim como, Garcia et al. (2008) e Peliciari-Garcia et al. (2010) que demonstraram o efeito potenciador da insulina sobre a síntese de melatonina em glândulas pineais *in vitro* através da ativação da PI3K, que na retina é a via de pró-sobrevivência que a insulina ativa.

Não há na literatura dados sobre a atividade da enzima AANAT retiniana de ratos diabéticos. O pouco que se tem conhecimento é sobre a AANAT da glândula pineal. Peschke et al. (2006) mostraram que ratos Goto Kakizaki, espontaneamente diabéticos tipo 2, apresentam diminuição tanto da síntese de melatonina como da atividade da AANAT. E Amaral (2009) demonstrou a diminuição da síntese de melatonina e atividade da AANAT na glândula pineal de animais diabéticos induzidos por STZ.

Esses dados mostram que a redução na síntese de melatonina observada na glândula pineal em ratos diabéticos induzidos por STZ é também observado na retina, um dos tecidos que possui síntese local de melatonina.

As curvas de expressão gênica da referida enzima apresentaram a variação diária já descrita por Sakamoto et al. (2006). Em ambos os grupos o período de maior expressão foi durante a noite com pico no ZT18, porém, surpreendentemente o grupo diabético apresentou maior quantidade de transcritos do gene da AANAT do que o grupo controle. Esse resultado não era esperado, porém coincidem com os resultados relatados por Peschke et al. (2008) que encontraram um aumento na expressão do gene da AANAT na glândula pineal de ratos diabéticos induzidos por STZ.

Levando em consideração que há uma diminuição na atividade da AANAT na retina do grupo diabético, não relacionada à expressão gênica, postula-se a existência de mecanismos pós-transcricionais ou pós-traducionais reguladores da atividade dessa enzima, regulando possivelmente a tradução, a estabilidade e/ou o grau de fosforilação desta proteína, fazendo com que sua atividade diminua na retina de ratos diabéticos.

Sabendo que a expressão do gene da AANAT é regulada tanto pelo complexo CLOCK/BMAL como pelo ciclo claro/escuro ambiental através da via do AMPc que, além disso, controla também a estabilidade desta proteína, foi feito a análise do conteúdo desse segundo mensageiro nas retinas. Como pode ser visto na figura 15 o conteúdo de AMPc nas retinas do grupo controle foi maior do que no grupo diabético nos ZT6 e ZT15. O resultado encontrado no grupo controle está de acordo com Fukuhara et al. (2004) que descreveram um aumento na quantidade de AMPc na retina de ratos no final do período de claro e em todo o período de escuro. Não há dados na literatura sobre o conteúdo de AMPc na retina de ratos diabéticos. O resultado do grupo diabético mostra uma redução no ZT15, esse dado justifica a diminuição da atividade da enzima AANAT observada também no ZT15, já que o AMPc regula a estabilidade desta enzima por ativar PKA e esta por sua vez fosforila AANAT protegendo-a da degradação proteossomal, refletindo dessa forma na síntese de melatonina.

Por outro lado é sabido que a PKA fosforila CREB e que este se liga ao sítio CRE na região promotora do gene da AANAT aumentando sua expressão. Com a diminuição do AMPc e conseqüente redução de atividade da PKA esperava-se uma redução na quantidade do RNA mensageiro da AANAT, porém, como citado anteriormente, o resultado encontrado foi o oposto, um aumento em relação ao controle. Isso mostra que a redução do conteúdo de AMPc nas retinas do grupo diabético não refletiu na expressão gênica da AANAT. Dados na literatura mostram, na glândula pineal, que um aumento submáximo no conteúdo de AMPc é suficiente para produzir máxima fosforilação de CREB (Roseboom e Klein, 1994). Não é

sabido se o mesmo ocorre na retina, entretanto esse dado justifica o porquê a diminuição do conteúdo de AMPc no grupo diabético não afetou na expressão gênica da AANAT.

Como a AC1 é responsável pelo aumento de AMPc na retina, foi feita a análise do RNA mensageiro desta enzima. No grupo controle observou-se um pico de expressão no meio do dia (ZT6) e um segundo pico na transição do dia para noite (ZT12) que diminui gradualmente até chegar ao nível basal no ZT21 aumentando novamente no ZT24, como descrito por Fukuhara et al. (2004). Interessantemente, o perfil de expressão do RNAm da AC1 encontrado é correspondente ao perfil do conteúdo de AMPc demonstrado na figura 16, existindo um atraso de 3 horas entre os picos de expressão do RNAm da AC1 e os picos no montante de AMPc. No grupo diabético ocorreu a perda do perfil observado no grupo controle havendo um aumento no ZT6 que perdura até o ZT15, sendo a amplitude dessa variação muito menor da encontrada no grupo controle. Acredita-se que essa mudança no perfil de expressão do RNAm da AC1 possa, de alguma forma, levar a diminuição do conteúdo de AMPc observados nos ZT6 e ZT15.

Sabe-se que o relógio circadiano regula a expressão gênica da AC1 controlando o período do dia em que a síntese de AMPc possa ser maximamente estimulada pelo escuro. Esse controle circadiano de expressão da AC1 é devido à presença de um E-BOX, na região promotora desse gene, responsivo ao complexo ativador CLOCK/BMAL. Portanto estudou-se a expressão do gene relógio *bmal1*. No grupo controle foi obtido um pico de expressão no meio do dia (ZT6) e um segundo pico na transição do dia para noite (ZT12) que se mantém até alcançar o nível basal no ZT21, aumentando novamente no ZT24. Esse perfil de expressão do gene *bmal1* observado no grupo controle reflete no perfil de expressão do gene da AC1, revelando o controle do sistema circadiano na expressão gênica dessa enzima. Surpreendentemente, no grupo diabético foi perdido o perfil de expressão observado no grupo controle. Foi encontrada uma alta quantidade de transcritos que se mantém constante ao longo das 24 horas, implicando no comprometimento da expressão gênica da AC1 observada no grupo diabético.

Pode-se concluir que a expressão arritmica do gene relógio *bmal1* obtida no grupo diabético comprometeu diretamente a expressão gênica da enzima AC1, implicando na síntese reduzida de AMPc. Frente a esses resultados especula-se que, a redução no conteúdo de AMPc refletiu, conseqüentemente, na redução de ativação da PKA afetando diretamente a fosforilação da AANAT, contribuindo para degradação proteassomal diminuindo, dessa forma, sua atividade e a síntese de melatonina.

Continuando o estudo na via de síntese de melatonina, a segunda enzima analisada foi a TPH1. Em ambos os grupos não há um padrão diário de atividade desta enzima. Thomas e Iuvone (1991) mostraram que na retina de galinha existe uma variação diária na atividade da TPH, com atividade 4.4 vezes maior no meio da noite do que no meio do dia, o que não se confirma, aqui, para o rato.

Já Valenciano Alonso-Gómez e Iuvone (1999) mostraram em retinas de *Xenopus laevis* um ritmo circadiano de atividade tanto em retinas intactas, com valores altos durante o dia, como na camada fotorreceptora isolada, com altos valores durante a noite. O trabalho sugere que a atividade obtida de retinas intactas reflete principalmente a atividade enzimática dos neurônios serotoninérgicos (células amácrinas), mascarando a dos fotorreceptores que representa 24% da atividade total a qual é destinada à biossíntese de melatonina.

Não há na literatura dados sobre a atividade da TPH na retina de ratos. Segundo Chanut et al. (2002) a enzima passo limitante na síntese de serotonina, TPH, não foi detectada por métodos imuno-histoquímicos na retina de ratos. Porém a atividade dessa enzima parece ocorrer, pois o tratamento com paraclorofenilalanina, inibidor da TPH, diminui a concentração de serotonina na retina de rato (Lima e Urbina, 1994).

Como não houve diferença entre o grupo controle e o grupo diabético presume-se que essa enzima não é afetada em condições hipoinsulinêmicas e hiperglicêmicas, e tampouco afeta a síntese de melatonina nessas condições.

Quanto ao perfil de expressão do RNA mensageiro desta enzima, apesar de não haver um ritmo diário definido para nenhum dos grupos, demonstra-se uma diferença entre o grupo controle e o grupo diabético somente no ZT9, onde o grupo controle atinge o menor valor e o grupo diabético o pico de expressão.

A terceira enzima analisada foi a HIOMT, a última enzima na via de síntese da melatonina. É sabido que o ciclo claro/escuro ambiental tem um efeito regulatório sobre as quantidades de RNA mensageiro dessa enzima, tanto na glândula pineal como na retina e, segundo Gauer e Craft (1996), em ambos os tecidos, em ratos, é observado um aumento noturno na expressão desta enzima, além de um sutil aumento no período claro na retina. Na retina de galinhas é observado um aumento noturno em sua expressão (Voisin et al., 1994).

No presente trabalho, o RNA mensageiro dessa enzima apresenta um ritmo diário com valores mais altos durante o dia com pico no ZT6 em ambos os grupos. Durante o período noturno há um pequeno pico no ZT18 sendo mais sutil no grupo diabético, não havendo diferença estatística entre controles e diabéticos.

Wiechmann e O'Steen (1990) mostraram a atividade e a imunoreatividade da enzima HIOMT tanto nas células bipolares como na camada fotorreceptora da retina de ratos.

Portanto, pode-se supor que os nossos resultados representam tanto o perfil de expressão da enzima HIOMT nas células bipolares como na camada fotorreceptora, já que se trabalhou com a retina inteira. E, provavelmente, o pico observado no período noturno representa o RNA mensageiro da HIOMT presente na camada fotorreceptora que participa na síntese de melatonina local.

Sabendo que a ativação do receptor de insulina medeia à via de pró-sobrevivência nos neurônios da retina (Reiter et al., 2003) e da relação entre insulina e a síntese de melatonina na glândula pineal, avaliamos a expressão deste receptor na retina de ratos diabéticos. Não houve diferença no perfil de expressão deste receptor em relação ao grupo controle, indicando que 3 dias de condição diabética não altera sua expressão. Esse resultado está de acordo com Reiter et al. (2006), que mostrou em retina de ratos a diminuição da expressão, autofosforilação e atividade somente após 12 semanas da indução do quadro diabético. Provavelmente, além da integridade da expressão gênica do receptor de insulina a sua síntese e afinidade devem ter-se mantido dentro da normalidade uma vez que, a insulina terapêuticamente reposta foi capaz de agir na retina restabelecendo a síntese de melatonina.

Devido à presença de uma barreira hemato-retiniana a glicose não passa livremente do sangue para a retina, esse transporte é facilitado pelo GLUT1. Foi feito então a análise da expressão do transportador de glicose frente à hiperglicemia. Novamente não foi encontrada diferença estatística entre os grupos controle e diabético. Esse mesmo resultado foi descrito por Fernandes et al. (2004), que relataram que não há diferença significativa na quantidade do RNA mensageiro do GLUT1 após 48 horas de hiperglicemia ou 4 meses do início do quadro diabético. Segundo esses mesmos autores a regulação desse transportador de glicose ocorre a nível protéico onde há uma queda de 50% em relação aos animais normoglicêmicos, decorrente da degradação protéica devido à ubiquitinação.

Não está completamente definido o mecanismo pelo qual a deficiência de insulina e conseqüentemente a hiperglicemia causam a retinopatia diabética. Dados na literatura apontam a hiperglicemia como o maior fator responsável pelas complicações diabéticas e que o dano celular ocorre em células que não são capazes de controlar, adequadamente, o transporte de glicose intracelular quando expostas a hiperglicemia, como por exemplo, células endoteliais dos capilares da retina, mesangiais do glomérulo renal, neurônios e células de schwann em nervos periféricos (Brownlee, 2005). Por outro lado, dados apontam que a falta de

insulina e/ou qualquer disfunção em sua via de sinalização possuem um importante papel na patogênese da retinopatia diabética (Reiter et al., 2003).

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos conclui-se que há uma significativa redução na síntese de melatonina nas retinas dos animais diabéticos devido à diminuição de atividade da enzima AANAT e que o tratamento com insulina foi eficaz em restabelecer ambos os parâmetros. Conclui-se que a diminuição da atividade da AANAT deve-se a redução no conteúdo de AMPc, e a queda no montante de AMPc é reflexo da alteração no perfil de expressão gênica da AC1 que pode ser justificada pela expressão arritmica do gene relógio *bmal1*.

Mediante a esses dados, pode-se supor que as retinas dos animais diabéticos estão mais vulneráveis aos danos decorrentes do quadro diabético, já que a proteção antioxidante da melatonina está diminuída.

Conclui-se também que as outras enzimas (TPH e HIOMT) envolvidas na síntese de melatonina não foram afetadas em 3 dias do início do quadro diabético, assim como a expressão gênica do transportador de glicose e do receptor de insulina.

REFERÊNCIAS *

Amaral GF. Perfil diário e os mecanismos de produção de melatonina pela glândula pineal de ratos diabéticos por estreptozotocina [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care*. 2008;31(Suppl 1):S55-S60.

American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes care*. 2009;32(Suppl 1):S13-S61.

Aksoy N, Vural H, Sabuncu T, Aksoy S. Effects of melatonin on oxidative-antioxidative status of tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct*. 2003;21(2):121-5.

Baba K, Pozdeyev N, Mazzoni F, Contreras-Alcantara S, Liu C, Kasamatsu M, Martinez-Merlos T, Strettoi E, Iuvone PM, Tosini G. Melatonin modulates visual function and cell viability in the mouse retina via the MT1 melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(35):15043-8.

Badr GA, Tang J, Ismail-Beigi F, Kern TS. Diabetes downregulates GLUT1 expression in the retina and its microvessels but not in the cerebral cortex or its microvessels. *Diabetes*. 2000;49(6):1016-21.

Baler R, Covington S, Klein DC. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J Biol Chem*. 1997;272(11):6979-85.

Barber AJ, Dabulis S, Khin S, Lieth E, Gardner TW. 1997. Diabetic conditions cause apoptosis in retinal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;37:S771.

Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest*. 1998;102(4):783-91.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2010 November 25].

Barber AJ, Nakamura M, Wolpert EB, Reiter CE, Seigel GM, Antonetti DA, Gardner TW. Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of caspase-3. *J Biol Chem.* 2001;276(35):32814-21.

Barrett P, Davidson G, Hazlerigg DG, Morris MA, Ross AW, Morgan PJ. Mel 1a melatonin receptor expression is regulated by protein kinase C and an additional pathway addressed by the protein kinase C inhibitor Ro 31-8220 in ovine pars tuberalis cells. *Endocrinology.* 1998;139(1):163-71.

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

Baydas G, Tuzcu M, Yasar A, Baydas B. Early changes in glial reactivity and lipid peroxidation in diabetic rat retina: effects of melatonin. *Acta Diabetol.* 2004;41(3):123-128.

Besharse JC, Dunis DA. Methoxyindoles and photoreceptor metabolism: activation of rod shedding. *Science.* 1983;219:1341-1343.

Bognár LK, Hall A, Adam E, Thain SC, Nagy F, Millar AJ. The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor, phytochrome B. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96:14652-57.

Bosco A, Lerário AC, Soriano D, Santos RF, Massote P, Galvão D, Franco ACHM, Purisch S, Ferreira AR. Retinopatia diabética. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49(2):217-27.

Boyd TAS, Mcleod LE. Circadian rhythm of plasma corticoid levels, intraocular pressure and aqueous outflow facility in normal and glaucomatous eyes. *Ann NY Acad Sci.* 1964;117:567-613.

Brandenburg J, Bobbert AC, Eggelmeyer E. Circadian changes in the responses of the rabbit's retina to flashes. *Behav Brain Res.* 1983;7:113-23.

Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54(6):1615-25.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414(6865):813-20.

Cam M, Yavuz O, Guven A, Ercan F, Bukan N, Ustündag N. Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pineal Res.* 2003;35(3):212-20.

Carvalho JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de Sinalização da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002;46(4):419-25.

Chan GC, Lernmark U, Xia Z, Storm DR. DNA elements of the type 1 adenylyl cyclase gene locus enhances reporter gene expression in neurons and pinealocytes. *Eur J Neurosci.* 2001;13(11):2054-66.

Chanut E, Nguyen-Legros J, Labarthe B, Trouvin JH, Versaux-Botteri C. Serotonin synthesis and its light-dark variation in the rat retina. *J Neurochem.* 2002;83(4):863-9.

Champney TH, Brainard GC, Richardson BA, Reiter RJ. Experimentally-induced diabetes reduces nocturnal pineal melatonin content in the Syrian hamster. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* 1983;76(1):199-201.

Champney TH, Holtorf AP, Craft CM, Reiter RJ. Hormonal modulation of pineal melatonin synthesis in rats and Syrian hamsters: effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin injections. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* 1986;83(2):391-5.

Chen W, Baler R. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000;81(1-2):43-50.

Cipolla-Neto J, Afeche SC. Glândula Pineal. In: Aires MM, editor. *Fisiologia*. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2008. p. 981-990.

Colantuoni A, Longoni B, Marchiafava PL. Retinal photoreceptors of Syrian hamsters undergo oxidative stress during streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2002;45(1):121-4.

Coon SL, Del Olmo E, Young WS 3rd, Klein DC. Melatonin synthesis enzymes in *Macaca mulatta*: focus on arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(10):4699-706.

Deguchi T, Axelrod J. Sensitive assay for serotonin N-acetyltransferase activity in rat pineal. *Anal Biochem.* 1972;50(1):174-9.

Delaney CA, Dunger A, DiMatteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability. *Biochem Pharmacol.* 1995;50(12):2015-20.

Dmitriev AV, Mangel SC. Circadian clock regulation of pH in the rabbit retina. *J Neurosci.* 2001;21:2897–2902.

Donder E, Baydas G, Ozkan Y, Ercel E, Yalnız M, Dogan H. Investigation of antioxidant effect of melatonin against carbon tetrachloride toxicity in various tissues. *Biomed Res.* 1999;10:141–145.

Doyle SE, McIvor WE, Menaker M. Circadian rhythmicity in dopamine content of mammalian retina: role of the photoreceptors. *Journal of Neurochemistry.* 2002;83:211–9.

Emery PT, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M. CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell.* 1998;95:669–79.

Fernandes R, Carvalho AL, Kumagai A, Seica R, Hosoya K, Terasaki T, Murta J, Pereira P, Faro C. Downregulation of retinal GLUT1 in diabetes by ubiquitinylation. *Mol Vis.* 2004;10:618-28.

Fukuhara C, Dirden JC, Tosini G. Photic regulation of melatonin in rat retina and the role of proteasomal proteolysis. *Neuroreport.* 2001;12(17):3833-7.

Fukuhara C, Liu C, Ivanova TN, Chan GC, Storm DR, Iuvone PM, Tosini G. Gating of the cAMP signaling cascade and melatonin synthesis by the circadian clock in mammalian retina. *J Neurosci.* 2004;24(8):1803-11.

Gabbay KH, Merola LO, Field RA. Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science.* 1966;151:209 –10.

Garcia RA, Afeche SC, Scialfa JH, do Amaral FG, dos Santos SH, Lima FB, Young ME, Cipolla-Neto J. Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. *Life Sci.* 2008;82(1-2):108-14.

Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature.* 2005;438(7070):960-6.

Gauer F, Craft CM. Circadian regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA levels in rat pineal and retina. *Brain Res.* 1996;737(1-2):99-109.

Green CB, Besharse JC. Retinal circadian clocks and control of retinal physiology. *Journal of Biological Rhythms.* 2004;19:91-102.

Guenther AL, Schmidt SI, Laatsch H, Fotso S, Ness H, Ressmeyer AR, Poeggeler B, Hardeland R. Reactions of the melatonin metabolite AMK (N1-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *J Pineal Res.* 2005;39(3):251-60.

Gül M, Emre S, Eşrefoğlu M, Vard N. Protective effects of melatonin and aminoguanidine on the cornea in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cornea.* 2008;27(7):795-801

Harmer SL, Panda S, Kay SA. Molecular bases of circadian rhythms. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:215-53.

Herichová I, Zeman M, Stebelová K, Ravingerová T. Effect of streptozotocin-induced diabetes on daily expression of *per2* and *dbp* in the heart and liver and melatonin rhythm in the pineal gland of Wistar rat. *Mol Cell Biochem.* 2005;270(1-2):223-9.

Hirota T, Fukada Y. Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoological Science.* 2004;21:359-68.

International Diabetes Federation. What is diabetes? IDF. [cited 2010 May 26]. Available from: <http://www.idf.org/node/1049?unode=3B96844A-C026-2FD3-87E85FD2293F42E9>

Iuvone PM, Tosini G, Pozdeyev N, Haque R, Klein DC, Chaurasia SS. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retin Eye Res.* 2005;24(4):433-56.

Iuvone PM, Brown AD, Haque R, Weller J, Zawilska JB, Chaurasia SS, Ma M, Klein DC. Retinal melatonin production: role of proteasomal proteolysis in circadian and photic control of arylalkylamine N-acetyltransferase. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(2):564-72.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, editores. *Princípios da neurociência.* Pereira ACG, tradutor. 4th ed. São Paulo: Manole; 2003. 1412 p.

Karunanayake EH, Baker JR, Christian RA, Hearse DJ, Mellows G. Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of (14C)-streptozotocin in the rat. *Diabetologia*. 1976;12:123-8.

Klein DC, Roseboom PH, Coon SL. New light is shining on the melatonin rhythm enzyme. The first poscloning view. *Trends Endocrinol Metab*. 1996;7:106-12.

Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet*. 2006;15 Spec No 2:R271-7.

Kollias AN, Ulbig MW. Diabetic retinopathy: Early diagnosis and effective treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(5):75-83.

Kumagai AK, Vinores SA, Pardridge WM. Pathological upregulation of inner blood-retinal barrier Glut1 glucose transporter expression in diabetes mellitus. *Brain Res*. 1996;706(2):313-7.

La Vail MM. Rod outer segment disk shedding in the rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science*. 1976;194:1071-3.

Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216-26.

Lima L, Urbina M. Dopamine and serotonin turnover rate in the retina of rabbit, rat, goldfish, and *Eugerres plumieri*: light effects in goldfish and rat. *J Neurosci Res*. 1994;39(5):595-603.

Liu C, Fukuhara C, Wessel JH 3rd, Iuvone PM, Tosini G. Localization of Aa-nat mRNA in the rat retina by fluorescence in situ hybridization and laser capture microdissection. *Cell Tissue Res*. 2004;315(2):197-201.

Lopez-Molina L, Conquet F, Dubois-Dauphin M, Schibler U. The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J*. 1997;16:6762-71.

Lowrey PL, Takahashi JS. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:407-41.

Lynch HJ, Eng JP, Wurtman RJ. Control of pineal indole biosynthesis by changes in sympathetic tone caused by factors other than environmental lighting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973;70(6):1704-7.

Mayo JC, Sainz RM, Uria H, Antolin I, Esteban MM, Rodriguez C. Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. *J Pineal Res*. 1998;24(3):179-92.

Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieder FW, Barres BA. Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron*. 1995;15(4):805-19.

Montilla PL, Vargas JF, Túnez IF, Muñoz de Agueda MC, Valdelvira ME, Cabrera ES. Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. *J Pineal Res*. 1998;25(2):94-100.

Morgan CR, Lazarow A. Immunoassay of insulin: two antibodies system. *Diabetes*. 1962;110:29-32.

Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int*. 1994;24(2):101-46.

Moore-Ede CM, Sulzman FM, Fuller CA. 1982. *The Clocks That Time Us*. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press; 1982. 448 p.

Moore RY, Circadian timing. In: Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, editors. *Fundamental Neuroscience*. New York: Academic Press; 1999. p. 1189-206.

Munoz E, Baler R. The circadian E-box: when perfect is not good enough. *Chronobiol Int*. 2003;20:371-88.

Nakamura M, Barber AJ, Antonetti DA, LaNoue KF, Robinson KA, Buse MG, Gardner TW. Excessive hexosamines block the neuroprotective effect of insulin and induce apoptosis in retinal neurons. *J Biol Chem*. 2001;276(47):43748-55.

Niki T, Hamada T, Ohtomi M, Sakamoto K, Suzuki S, Kako K, Hosoya Y, Horikawa K, Ishida N. The localization of the site of arylalkylamine N-acetyltransferase circadian expression in the photoreceptor cells of mammalian retina. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;248(1):115-20.

O'Brien IA, Lewin IG, O'Hare JP, Arendt J, Corrall RJ. Abnormal circadian rhythm of melatonin in diabetic autonomic neuropathy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1986;24(4):359-64.

Obrosova IG, Fathallah L, Greene DA. Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: effect of DL-alpha-lipoic acid. *Eur J Pharmacol*. 2000;398:139-46.

Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, Golden SS, Johnson CH. Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:8660-4.

Osborne NN, Nash MS, Wood JP. Melatonin counteracts ischemia-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(12):2374-83.

Pang SF, Tang F, Tang PL. Alloxan-induced diabetes and the pineal gland: differential effects on the levels of pineal N-acetylserotonin, pineal melatonin, and serum melatonin. *J Pineal Res*. 1985;2(1):79-85.

Pang SF, Yu HS, Suen HC, Brown GM. Melatonin in the retina of rats. A diurnal rhythm. *J Endocrinol*. 1980;87:89-93.

Parfitt A, Weller JL, Klein DC, Sakai KK, Marks BH. Blockade by ouabain or elevated potassium ion concentration of the adrenergic and adenosine cyclic 3',5'-monophosphate-induced stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Mol Pharmacol*. 1975;11(3):241-55.

Park SH, Park JW, Park SJ, Kim KY, Chung JW, Chun MH, Oh SJ. Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia*. 2003;46(9):1260-8.

Peliciari-Garcia RA, Marçal AC, Silva JA, Carmo-Buonfiglio D, Amaral FG, Afeche SC, Cipolla-Neto J, Carvalho CR. Insulin temporal sensitivity and its signaling pathway in the rat pineal gland. *Life Sci*. 2010;87(5-6):169-74.

Peschke E, Frese T, Chankiewicz E, Peschke D, Preiss U, Schneyer U, Spessert R, Mühlbauer E. Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res*. 2006;40(2):135-43.

Peschke E, Wolgast S, Bazwinsky I, Pönicke K, Muhlbauer E. Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes. *J Pineal Res.* 2008;45(4):439-48.

Pozdeyev N, Taylor C, Haque R, Chaurasia SS, Visser A, Thazyeen A, Du Y, Fu H, Weller J, Klein DC, Iuvone PM. Photic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase binding to 14-3-3 proteins in retinal photoreceptor cells. *J Neurosci.* 2006;26(36):9153-61

Pupo Ade A, Marreiro D. Dosage of insulin levels using radioimmunoassay with double antibodies. *AMB Rev Assoc Med Bras.* 1970;16(5):153-6.

Puro DG, Agardh E. Insulin-mediated regulation of neuronal maturation. *Science.* 1984;225(4667):1170-2.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM, editors. *Neuroscience*. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001.

Rajala RV, Anderson RE. Rhodopsin-regulated insulin receptor signaling pathway in rod photoreceptor neurons. *Mol Neurobiol.* 2010;42(1):39-47.

Reiter CE, Wu X, Sandirasegarane L, Nakamura M, Gilbert KA, Singh RS, Fort PE, Antonetti DA, Gardner TW. Diabetes reduces basal retinal insulin receptor signaling: reversal with systemic and local insulin. *Diabetes.* 2006;55(4):1148-56.

Reiter CE, Sandirasegarane L, Wolpert EB, Klinger M, Simpson IA, Barber AJ, Antonetti DA, Kester M, Gardner TW. Characterization of insulin signaling in rat retina in vivo and ex vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285(4):E763-74.

Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, D'Arpa D, Sainz RM, Mayo JC, Ramos S. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. *Biol Signals Recep.* 1999;8:56–63.

Reiter RJ, Tan DX, Gitto E, Sainz RM, Mayo JC, Leon J, Manchester LC, Vijayalaxmi, Kilic E, Kilic U. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Pol J Pharmacol.* 2004;56(2):159-70.

Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;939:200–15.

Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002;418:935-941.

Roseboom PH, Klein DC. Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol*. 1995;47(3):439-49.

Sakamoto K, Liu C, Kasamatsu M, Iuvone PM, Tosini G. Intraocular injection of kainic acid does not abolish the circadian rhythm of arylalkylamine N-acetyltransferase mRNA in rat photoreceptors. *Mol Vis*. 2006;12:117-24.

Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Shah CA. Diabetic retinopathy: A comprehensive review. *Indian J Med Sci*. 2008;62(12):500-19.

Silva SO, Rodrigues MR, Carvalho SR, Catalani LH, Campa A, Ximenes VF. Oxidation of melatonin and its catabolites, N1-acetyl-N2 -formyl-5-methoxykynuramine and N1-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. *J Pineal Res*. 2004;37(3):171-5.

Stebelová K, Herichová I, Zeman M. Diabetes induces changes in melatonin concentrations in peripheral tissues of rat. *Neuro Endocrinol Lett*. 2007;28(2):159-65.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):537-46.

Tang J, Zhu XW, Lust WD, Kern TS. Retina accumulates more glucose than does the embryologically similar cerebral cortex in diabetic rats. *Diabetologia*. 2000;43(11):1417-23.

Thomas KB, Iuvone PM. Circadian rhythm of tryptophan hydroxylase activity in chicken retina. *Cell Mol Neurobiol*. 1991;11(5):511-27.

Tjälve H, Wilander E, Johansson EB. Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J Endocrinol*. 1976;69:455–6.

Tutuncu NB, Batur MK, Yildirim A, Tutuncu T, Deger A, Koray Z, Erbas B, Kabakci G, Aksoyek S, Erbas T. Melatonin levels decrease in type 2 diabetic patients with cardiac autonomic neuropathy. *J Pineal Res*. 2005;39(1):43-9.

Tosini G, Fukuhara C. Photic and circadian regulation of retinal melatonin in mammals. *J Neuroendocrinol.* 2003;15(4):364-9.

Tosini G, Menaker M. The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res.* 1998;789:221-8.

Tosini G, Pozdeyev N, Sakamoto K, Iuvone PM. The circadian clock system in the mammalian retina. *Bioessays.* 2008;30(7):624-33.

University of Utah Health Sciences Center. Webvision - The Organization of the Retina and Visual System. Salt Lake City (UT): UUHSC. [cited 2010 Jun 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=webvision&part=A34>.

Valenciano AI, Alonso-Gómez AL, Iuvone PM. Diurnal rhythms of tryptophan hydroxylase activity in *Xenopus laevis* retina: opposing phases in photoreceptors and inner retinal neurons. *Neuroreport.* 1999;10(10):2131-5.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7): research0034.1-0034.11.

Voisin P, Guerlotte J, Bernard M, Greve P, Grechez-Cassiau A, Collin JP. Regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression in the pineal gland and retina. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 1994;54(Suppl)41-6.

Von Schantz M, Lucas RJ, Foster RG. Circadian oscillation of photopigment transcript levels in the mouse retina. *Molecular Brain Research.* 1999;72:108-114.

Xia Z, Choi EJ, Wang F, Blazynski C, Storm DR. Type I calmodulin-sensitive adenylyl cyclase is neural specific. *J Neurochem.* 1993;60(1):305-11.

Yano S, Morioka M, Fukunaga K, Kawano T, Hara T, Kai Y, Hamada J, Miyamoto E, Ushio Y. Activation of Akt/protein kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21(4):351-60.

Walker JA, Olton DS. Circadian rhythm of luminance detectability in the rat. *Physiol Behav.* 1979;23:17-21.

Wiechmann AF, O'Steen WK. Hydroxyindole-O-methyltransferase in rat retinal bipolar cells: persistence following photoreceptor destruction. *Brain Res.* 1990;506(1):14-8.

Wiechmann AF, Summers JA. Circadian rhythms in the eye: the physiological significance of melatonin receptors in ocular tissues. *Prog Retin Eye Res.* 2008;27(2):137-60.

Wu X, Reiter CE, Antonetti DA, Kimball SR, Jefferson LS, Gardner TW. Insulin promotes rat retinal neuronal cell survival in a p70S6K-dependent manner. *J Biol Chem.* 2004;279(10):9167-75.

ANEXO A - Sequências dos padrões para PCR em tempo real

Triptofano hidroxilase 1 (Tph1) - Fragmento clonado e blast da sequência:

NNNCCATTNNNNNATAAGGCCAATCAGCTCCGGCCGCCTGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCT
CTTGAGCTTCAGAGGAGACGGTTCAGAACTGGCAACGTGCTACTTCTTCACTGTGGAGTT
TGGACTGTGCAAGCAAGATGGGCAGCTGAGAGTCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGC
AGGTTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGT
CACCTAAATAGCTTGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT
CACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG
TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTG
TGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTC
TTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAG
CTCACTCAAAGGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATG
TGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCA
TAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC
CGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTT
CCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTC
TCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCNAGCTGGGCTGTG
TGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGGTACTATCGTCTTGAGTCC
AACCCGGT

Pontos de inserção e sítios de restrição para EcoR I

Fragmento clonado

> [ref|NM_001100634.1|](#) Rattus norvegicus tryptophan hydroxylase 1 (Tph1), mRNA
Length = 1726

[GENE ID: 24848 Tph1](#) | tryptophan hydroxylase 1 [Rattus norvegicus]
(Over 10 PubMed links)

Score = 182 bits (98), Expect = 8e-46
Identities = 98/98 (100%), Gaps = 0/98 (0%)
Strand = Plus/Plus

Query 1 CTCTTGAGCTTCAGAGGAGACGGTTCAGAACTGGCAACGTGCTACTTCTTCACTGTGG 60
|||||
Sbjct 964 CTCTTGAGCTTCAGAGGAGACGGTTCAGAACTGGCAACGTGCTACTTCTTCACTGTGG 1023

Query 61 AGTTTGACTGTGCAAGCAAGATGGGCAGCTGAGAGTC 98
|||||
Sbjct 1024 AGTTTGACTGTGCAAGCAAGATGGGCAGCTGAGAGTC 1061

Arilalquilamina-N-acetiltransferase (Aanat) - Fragmento clonado e blast da sequência:

NNNCCCACCATATCACGCGTGGGGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGC**GAATTC**
ACTAGTGATTAAAGTACACTCAGGCACCAATGTGCTGGCTCACCTGCCTCCCTAGTTCCCCT
TCTATCCTGGTCCCCCTACCAGCCCCAGTACTGACACTAATAAAGCAGCTATGTTCCCAATC
GAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCCAATTCGCCCTATAG
TGAGTCGTATTACAATTCACCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG
TTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGT
AGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG
CGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTC
CCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTC
GACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGT
TTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAA
CAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCC
TATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTTACGCGAATTTTAACAAAAATATTAAC
GCTTTACATTTCTTGATGCGGTATTTTCTCCCTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCAT
CAGGTGGCACTTTTTTCGGGAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGGTTATTTTTCTAATACTTT
CAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAATGCTTCATTATATTGAAAAGGAAGAG
ATGAGTATTCACTTTCCGTGTCGCCCTAATCTTTTTTTCGGGATTTGGCTCCTGTTTTGGCA
CAAGAACGCTGGTGAATAAAAAGCTGAAACATTGGTGCCCATGGGTACTCAACGGATCTACG
CGGTAAACCTGAGAGTTCCCCCAAAGTTCCAGGAAACCTTTAGTTGCTTGGGCGGTA

Pontos de inserção e sítios de restrição para EcoR I

Fragmento clonado

> [ref|NM_012818.2|](#) Rattus norvegicus arylalkylamine N-acetyltransferase (Aanat), mRNA
Length = 1311

[GENE ID: 25120 Aanat](#) | arylalkylamine N-acetyltransferase [Rattus norvegicus]
(Over 10 PubMed links)

Score = 218 bits (110), Expect = 1e-56
Identities = 110/110 (100%), Gaps = 0/110 (0%)
Strand = Plus/Plus

Query 1 AAAGTACACTCAGGCACCAATGTGCTGGCTCACCTGCCTCCCTAGTTCCCCTTCTATCCT 60
|||||
Sbjct 1202 AAAGTACACTCAGGCACCAATGTGCTGGCTCACCTGCCTCCCTAGTTCCCCTTCTATCCT 1261

Query 61 GGTCCCCCTACCAGCCCCAGTACTGACACTAATAAAGCAGCTATGTTCCC 110
|||||
Sbjct 1262 GGTCCCCCTACCAGCCCCAGTACTGACACTAATAAAGCAGCTATGTTCCC 1311

Hidroxindol-oxi-metiltransferase (HIOMT) - Fragmento clonado e blast da sequência:

NNNAAAATTAGACAATCAGCTCCGGCCGCCTGGCGGCCGCGGGAATTTCGATTCTGGGAATTT
ATGACTTCTGGACCGTTACATTACAGCTGAGAGTCAGTCAGTTTTAGGCAGGAAGTGATGTC
ACAGTAATGGTGGGGTAGGGGACAATAAACGCACGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTG
CAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTG
TCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGC
TCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGA
GTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTC
GTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCT
CTTCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCA
GCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACAT
GTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTTC
ATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAC
CCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGT
TCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTT
CTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGATCGGTGTAAGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGT
GTGCACGATCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCCGTAACTATCGTCTTGAGTCA
ACCCGGTAGACACGACTATCGCCCTGGCATCAGCACTGTTACAGGATAGCAAACCAGGTGT
AGCGTGCTCCAGTTCTGAAGTTGGCTACTACGGTACATAGAGAAAAAATTGGGATCTGCT
TTGTTAACCATTTCCTTCGAAAGAGTTGTATTCTGGTTCGGCAACAACCCCTGGAAGTTGGT
TTTTTTGGCACCCAATACCCCCAAAAGGGTTCAAATCTTTATTTTCCGGGTTGACCCGGA
AAAACCGTTAGTTTGGCGAATCAAAGGCTCCTCCCTTATAAAAATTAAAC

Pontos de inserção e sítios de restrição para EcoR I

Fragmento clonado

```
> gb|L78306.1|RATHOM Rattus norvegicus hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA, complete  
cds  
Length = 1712  
  
Score = 193 bits (104), Expect = 1e-46  
Identities = 106/107 (99%), Gaps = 0/107 (0%)  
Strand = Plus/Plus  
  
Query 1 GTGGGAATTTATGACTTCTGGACCGTTACATTACAGCTGAGAGTCAGTCAGTTTTAGGCA 60  
|||||  
Sbjct 1603 GTGGGAATTTATGACTTCTGGACAGTTACATTACAGCTGAGAGTCAGTCAGTTTTAGGCA 1662  
  
Query 61 GGAAGTGATGTCACAGTAATGGTGGGGTAGGGGACAATAAACGCACG 107  
|||||  
Sbjct 1663 GGAAGTGATGTCACAGTAATGGTGGGGTAGGGGACAATAAACGCACG 1709
```

Adenilato ciclase 1 insulina (Adcy1) - Fragmento clonado e blast da sequência:

NNNNNNNNNNNNCNNNNNNGNNNNNGCCGCCNTGGCGGCCGCGGGAATTTCGATTTCGGGCTGGA
AGATGAGAATGAGAAACAGGAGCGGTTGCTCATGAGCCTCTTGCCCCGGAATGTCGCCATGG
AGATGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAAC
GCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGCGTAATCATGGT
CATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGA
AGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCG
CTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAAC
GCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTG
CGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATC
CACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGA
ACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCAC
AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTT
TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGT
CCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTTCTCATAGCTCACGCTGTANGTATCTCAGT
TCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCGACCG
CTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCAC
TGGNAGCAGCCACTGGTANCNGGATTAGCAGANCGANGTATGTAGGCGGNGCTACNGANTTC
TTGANTGGNNNTANNACGGCTACNCTANNNNANNNGTATTTNGNANNNNNNNNNCNNNGCTG
AAGCCANTTACCNN

Pontos de inserção e sítios de restrição para EcoR I

Fragmento clonado

[ref|NM_001107239.1|](#) Rattus norvegicus adenylate cyclase 1 (brain) (Adcy1), mRNA
Length=3219

GENE ID: 305509 Adcy1 | adenylate cyclase 1 (brain) [Rattus norvegicus]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 141 bits (156), Expect = 6e-34
Identities = 78/78 (100%), Gaps = 0/78 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	1	TGCGGCTGGAAGATGAGAATGAGAAACAGGAGCGGTTGCTCATGAGCCTCTTGCCCCGGA	60
Sbjct	617	TGCGGCTGGAAGATGAGAATGAGAAACAGGAGCGGTTGCTCATGAGCCTCTTGCCCCGGA	676
Query	61	ATGTCGCCATGGAGATGA	78
Sbjct	677	ATGTCGCCATGGAGATGA	694

Bmal1 (Arntl1) - Fragmento clonado e blast da sequência:

NNNNNNNNNNNNCNNNNNGNNNNNGGCCGCCNTGGCGGCCGCGGGAATTTCGATTCTTCCCTCGGTCACATCCTACGACAAACAAAATCCATCTGCTGCCCTGAGAATTAGGTGTTTCAGTTCGTCATCGGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCAATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACCAATCCACACAACATACGAGCCGGAA GCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGC GCTCGGTGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAA CCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACA AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTT CCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTC CGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGNGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTC GGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCT GCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGANACGACTTATCGCCACTG GNAGCAGCCACNNGNAACAGGATTAGCANANCGANGTATGTNGCGNTGCTACNNANTNCNTN AGTGNNNNNTACTACGGCTACNCTANANANNNNNTTTGNNTTTCNNCGCTCNNCTGNANCCAN TTACNNNCGGAAAAAANNNNN

Pontos de inserção e sítios de restrição para EcoR I

Fragmento clonado

> [ref|NM_024362.2|](#) Rattus norvegicus aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (Arntl), mRNA
Length=2991

[GENE ID: 29657 Arntl](#) | aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like [Rattus norvegicus] (10 or fewer PubMed links)

Score = 141 bits (156), Expect = 6e-34
Identities = 78/78 (100%), Gaps = 0/78 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query	1	TCTTCCCTCGGTCACATCCTACGACAAACAAAATCCATCTGCTGCCCTGAGAATTAGGT	60
Sbjct	1093	TCTTCCCTCGGTCACATCCTACGACAAACAAAATCCATCTGCTGCCCTGAGAATTAGGT	1034
Query	61	GTTTCAGTTCGTCATCGG	78
Sbjct	1033	GTTTCAGTTCGTCATCGG	1016

Receptor de insulina (Insr) - Fragmento clonado e blast da sequência:

NAAAAGGGGGCCAATCAGCTCCGGCCGCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTACGGATCTTTA
GGAACCTTGAGATTTCTTCAATGAGGCCAAGGTTAGCCTCTAGTTCAGCTGCCAGGTTGTTG
CCCCCTCGGATGTTGATAATCAGGCTGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGA
CCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAA
ATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATT
CCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTA
ACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGC
TGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCT
TCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTC
AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAA
AAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTC
CGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGG
ACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTTCGCTCTCCTGTTCCGACCC
TGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGC
TCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA
ACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCT

Pontos de inserção e sítios de restrição para EcoR I

Fragmento clonado

> [ref|NM_017071.1|](#) Rattus norvegicus insulin receptor (Insr), mRNA
Length = 5397

[GENE ID: 24954 Insr](#) | insulin receptor [Rattus norvegicus]
(Over 10 PubMed links)

Score = 185 bits (100), Expect = 7e-47
Identities = 100/100 (100%), Gaps = 0/100 (0%)
Strand = Plus/Minus

Query 1 ACGGATCTTTAGGAACCTGAGATTTCTTCAATGAGGCCAAGGTTAGCCTCTAGTTCAGC 60
|||||
Sbjct 1538 ACGGATCTTTAGGAACCTGAGATTTCTTCAATGAGGCCAAGGTTAGCCTCTAGTTCAGC 1479

Query 61 TGCCAGGTTGTTGCCCCCTCGGATGTTGATAATCAGGCTG 100
|||||
Sbjct 1478 TGCCAGGTTGTTGCCCCCTCGGATGTTGATAATCAGGCTG 1439

GLUT1 (Slc2a1) - Fragmento clonado e blast da sequência:

NNGGTAGTACGGGCCAGTCCAGTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGGCCACGAT
 ACTCAGATAGGACATCCAGGGCAGCTGCTCCAGCAGGGCCAGGGCGATGGTCATGAGCACAG
 CACAGCCCCGCATGCCAGCCAGACCAATGAGATGCAGGGTAATCACTAGTGAATTCGCGGCC
 GCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTA
 TAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTA
 TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCT
 AATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAAC
 CTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGG
 GCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGG
 TATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAG
 AACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTT
 TTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGC
 GAAACCCGACAGGACTATAAAGATACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCT
 CCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCG
 GCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGG
 GCTGTGTGCCCGAACCCCCCGGTTACCCCCGAACGCTGCGCCTTAATCCG

Pontos de inserção e sítios de restrição para EcoR I

Fragmento clonado

```
> ref|NM\_138827.1| Rattus norvegicus solute carrier family 2  
(facilitated glucose  
transporter), member 1 (Slc2a1), mRNA  
Length=2571
```

[GENE ID: 24778 Slc2a1](#) | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 [Rattus norvegicus] (Over 10 PubMed links)

Score = 201 bits (222), Expect = 1e-51
Identities = 111/111 (100%), Gaps = 0/111 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query	1	GGCCACGATACTCAGATAGGACATCCAGGGCAGCTGCTCCAGCAGGGCCAGGGCGATGGT	60
Sbjct	1321	GGCCACGATACTCAGATAGGACATCCAGGGCAGCTGCTCCAGCAGGGCCAGGGCGATGGT	1262
Query	61	CATGAGCACAGCACAGCCCGCCATGCCAGCCAGACCAATGAGATGCAGGGT	111
Sbjct	1261	CATGAGCACAGCACAGCCCGCCATGCCAGCCAGACCAATGAGATGCAGGGT	1211

β-actina (Actb) - Fragmento clonado e blast da sequência:

NAAAAGGGGGCCAATCAGCTCCGGCCGCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAAAGACCTCTAT
GCCAACACAGTGCTGTCTGGTGGCACCACCATGTACCCAGGCATTGCTGACAGGATGCAGAA
GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTGACCA
TATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATA
GCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCA
CACACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACT
CACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGC
ATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCC
TCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA
GGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG
GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGC
CCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACT
ATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGC
CGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCA
CGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACC
CCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCT

Pontos de inserção e sítios de restrição para EcoR I

Fragmento clonado

> [ref|NM_031144.2|](#) Rattus norvegicus actin, beta (Actb), mRNA
Length = 1296

[GENE ID: 81822 Actb](#) | actin, beta [Rattus norvegicus] (Over 10 PubMed links)

Score = 176 bits (194), Expect = 5e-44
Identities = 97/97 (100%), Gaps = 0/97 (0%)
Strand = Plus/Plus

Query 1 AAGACCTCTATGCCAACACAGTGCTGTCTGGTGGCACCACCATGTACCCAGGCATTGCTG 60
|||||
Sbjct 953 AAGACCTCTATGCCAACACAGTGCTGTCTGGTGGCACCACCATGTACCCAGGCATTGCTG 1012

Query 61 ACAGGATGCAGAAGGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAG 97
|||||
Sbjct 1013 ACAGGATGCAGAAGGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAG 1049

Proteína ribossomal L37a (Rpl37a) - Fragmento clonado e blast da sequência:

NNNNNGGGGGCGATCAGCCCCGGCCGCCAGGCGGCCGCGGGAATTCGATT**CGCTAAGTACACT**
TGCTCCTTCTGTGGCAAGACCAAGATGAAGAGACGAGCCGTTGGCATCTGGCATTGTGGTTC
CTGCATGAAAACAGTGGCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCGCTGCAGGTGCACCATATGGG
AGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGG
CGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAAC
ATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATT
AATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAAT
GAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTC
ACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGT
AATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGC
AAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCT
GACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAG
ATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTA
CCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGT
AGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGT
TCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTA

Pontos de inserção e sítios de restrição para EcoR I

Fragmento clonado

> [ref|NM_001100994.1|](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001100994.1) Rattus norvegicus ribosomal protein L37a (Rpl37a), mRNA
Length = 378

[GENE ID: 500547 RGD1561181 predicted](#) | RGD1561181 (predicted)
[Rattus norvegicus] (10 or fewer PubMed links)

Score = 172 bits (93), Expect = 5e-43
Identities = 93/93 (100%), Gaps = 0/93 (0%)
Strand = Plus/Plus

Query 1 CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTGTGGCAAGACCAAGATGAAGAGACGAGCCGTTGGCAT 60
|||||
Sbjct 121 CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTGTGGCAAGACCAAGATGAAGAGACGAGCCGTTGGCAT 180

Query 61 CTGGCATTGTGGTTCCTGCATGAAAACAGTGGC 93
|||||
Sbjct 181 CTGGCATTGTGGTTCCTGCATGAAAACAGTGGC 213

Gama-actina 1 (Actg1) - Fragmento clonado e blast da sequência:

NNNCCTTNNNNNNNNNGGTCAATCAGCTCGGCCGCGAGGCGGCCGCGGGAATCGATTTCCGAGC
TCGTTGTAGAAGGTGTGGTGCCAGATCTTCTCCATGTCGTCCCAGTTGGTGACAATGCCGTG
CTCAATAGGGTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCT
CCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAAT
CATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGA
GCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGC
GTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCG
GCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGAC
TCGCTGCGCTCGGTTCGCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACG
GTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGG
CCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAG
CATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCA
GGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGAT
ACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTAT
CTCAGTTCGGTGTAGGTTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCC
CGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCNNACCCGGTAGACACGACTTAT
CGCCACG

Pontos de inserção e sítios de restrição para EcoR I

Fragmento clonado

[ref|NM_001127449.1|](#) Rattus norvegicus actin, gamma, cytoplasmic 1 (Actg1), mRNA
Length = 1909

GENE ID: 287876 Actg1 | actin, gamma, cytoplasmic 1 [Rattus norvegicus]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 145 bits (160), Expect = 2e-32
Identities = 80/80 (100%), Gaps = 0/80 (0%)
Strand = Plus/Minus

Query 1 CGCAGCTCGTTGTAGAAGGTGTGGTGCCAGATCTTCTCCATGTCGTCCCAGTTGGTGACA 60
|||||
Sbjct 358 CGCAGCTCGTTGTAGAAGGTGTGGTGCCAGATCTTCTCCATGTCGTCCCAGTTGGTGACA 299

Query 61 ATGCCGTGCTCAATAGGGTA 80
|||||
Sbjct 298 ATGCCGTGCTCAATAGGGTA 279

ANEXO B - Artigos publicados ou submetidos

Como colaboradora:

Artigo 1

Caperuto LC, Anhê GF, Cambiaghi TD, Akamine EH, do Carmo Buonfiglio D, Cipolla-Neto J, Curi R, Bordin S. Modulation of bone morphogenetic protein-9 expression and processing by insulin, glucose, and glucocorticoids: possible candidate for hepatic insulin-sensitizing substance. *Endocrinology*. 2008; 149(12):6326-35.

Artigo 2

Peliciari-Garcia RA, Marçal AC, Silva JA, Carmo-Buonfiglio D, Amaral FG, Afeche SC, Cipolla-Neto J, Carvalho CR. Insulin temporal sensitivity and its signaling pathway in the rat pineal gland. *Life Sci*. 2010; 87(5-6):169-74.

Como primeira autora:

Artigo 3

Carmo-Buonfiglio D, Peliciari-Garcia RA, Peres R, Amaral FG, Nogueira TCA, Afeche SC, Cipolla-Neto J. Early-stage retinal melatonin synthesis impairment in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *IOVS*. (submitted).

Early-stage retinal melatonin synthesis impairment in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats

Journal:	<i>Investigative Ophthalmology & Visual Science</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Carmo-Buonfiglio, Daniella; Institute of Biomedical Sciences - University of São Paulo, Department of Physiology and Biophysics Peliciari-Garcia, Rodrigo; Institute of Biomedical Sciences - University of São Paulo, Department of Physiology and Biophysics Peres, Rafael; Institute of Biomedical Sciences - University of São Paulo, Department of Physiology and Biophysics Amaral, Fernanda; Institute of Biomedical Sciences - University of São Paulo, Department of Physiology and Biophysics Nogueira, Tatiane; Institute of Biomedical Sciences - University of São Paulo, Department of Physiology and Biophysics Afeche, Solange; Butantan Institute, Laboratory of Pharmacology Cipolla-Neto, José; Institute of Biomedical Sciences - University of São Paulo, Department of Physiology and Biophysics
Keywords:	retina, melatonin, diabetes, AANAT, circadian rhythm
Abstract:	<p>Purpose. Retinal melatonin synthesis occurs in the photoreceptor layer in a circadian manner and this indolamine controls several retinal physiologic rhythmic phenomena, including the characteristic of being the most powerful natural free radical scavenger. The purpose of the present work is evaluating the diurnal profile of retinal melatonin content and AANAT activity in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats.</p> <p>Methods. Male Wistar rats, entrained to a 12h:12h light/dark cycle, were diabetic-induced by an injection of streptozotocin. Insulin-treated diabetic animals received long action insulin in the beginning of the day and a mix of regular and long action insulin in the beginning of the night for three days. Animals were sacrificed every 3 hours throughout the 24h light/dark cycle for retinal melatonin content and AANAT activity analysis.</p> <p>Results. As expected, control animals showed a clear retinal melatonin daily rhythm with high levels at dark period. Interestingly, diabetic rats had their retinal melatonin content reduced related to control. On the other hand, immediate insulin treatment prevented melatonin synthesis reduction. The AANAT activity was found being higher in the dark and lower in the light period in the control group. This daily fluctuation was abolished in diabetic rats and was completely restored in insulin-treated</p>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	animals. Conclusion. The present data show a melatonin synthesis reduction in retinas of diabetic rats associated to a reduction in AANAT activity that may be prevented by insulin treatment. This impairment could compromise the physiological homeostasis in the retina where melatonin plays an important role modulating circadian functions.

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Review Only

Early-stage retinal melatonin synthesis impairment in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats

Daniella do Carmo-Buonfiglio¹, Rodrigo Antonio Peliciari-Garcia¹, Rafael Peres¹, Fernanda Gaspar do Amaral¹, Tatiane C Araujo Nogueira¹, Solange Castro Afeche², José Cipolla-Neto^{1*}

1:University of São Paulo, Institute of Biomedical Sciences, Department of Physiology and Biophysics, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, 1st floor, room 118, São Paulo, SP, CEP 05508-000, Brazil

2: Laboratory of Pharmacology, Butantan Institute, Av. Vital Brasil, 1500, São Paulo, SP, CEP 05503-900, Brazil

* Corresponding author. Telephone: +55 11 3091 7466; fax: +55 11 3091 7629.

E-mail address: cipolla@icb.usp.br (J. Cipolla-Neto).

Key Words: Retina, Diabetes, Melatonin, AANAT, circadian rhythm.

This work was supported by Sao Paulo State Research Foundation (FAPESP), grant n°04/06767-2, n°09/52920-0 and by fellowship n°141071/2005-2 from CNPq.

Word count: 2561

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Purpose. Retinal melatonin synthesis occurs in the photoreceptor layer in a circadian manner and this indolamine controls several retinal physiologic rhythmic phenomena, including the characteristic of being the most powerful natural free radical scavenger. The purpose of the present work is evaluating the diurnal profile of retinal melatonin content and AANAT activity in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats.

Methods. Male Wistar rats, entrained to a 12h:12h light/dark cycle, were diabetic-induced by an injection of streptozotocin. Insulin-treated diabetic animals received long action insulin in the beginning of the day and a mix of regular and long action insulin in the beginning of the night for three days. Animals were sacrificed every 3 hours throughout the 24h light/dark cycle for retinal melatonin content and AANAT activity analysis.

Results. As expected, control animals showed a clear retinal melatonin daily rhythm with high levels at dark period. Interestingly, diabetic rats had their retinal melatonin content reduced related to control. On the other hand, immediate insulin treatment prevented melatonin synthesis reduction. The AANAT activity was found being higher in the dark and lower in the light period in the control group. This daily fluctuation was abolished in diabetic rats and was completely restored in insulin-treated animals.

Conclusion. The present data show a melatonin synthesis reduction in retinas of diabetic rats associated to a reduction in AANAT activity that may be prevented by insulin treatment. This impairment could compromise the physiological homeostasis in the retina where melatonin plays an important role modulating circadian functions.

Introduction

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine), synthesized mainly by the pineal gland, is also produced in the retina of several vertebrate species. Retinal melatonin synthesis occurs in a subpopulation of photoreceptors ¹ and, as observed in the pineal gland, shows a clear daily variation with low levels during the light period and high levels at night ². Previous studies have demonstrated that the enzymes involved in melatonin synthesis are under circadian control at different levels, including transcriptional and posttranscriptional changes, although the details differ somewhat among species ³. Retinal arylalkylamine *N*-acetyltransferase (*Aanat*), the main regulatory enzyme in melatonin synthesis, mRNA levels and activity show a marked circadian variation in rat retina ⁴⁻⁶.

Retina of all classes of vertebrates contains an endogenous circadian clock. Several retinal physiologic phenomena were described as rhythmic, including rod disk shedding ⁷, visual sensitivity ⁸, melatonin release *in vivo* ² and *in vitro* ¹, dopamine synthesis ⁹, electroretinogram (ERG) b-wave amplitude ¹⁰, extracellular pH ¹¹ and intraocular pressure ¹². Many retinal rhythms are known to be synchronized, at least in part, by rhythmic melatonin and/or dopamine release ³.

Melatonin is one of the most powerful natural free radical scavenger ¹³ preventing oxidative damage to macromolecules including lipids, proteins and nucleic acids ^{14, 15}. Mehmet Gül ¹⁶ has shown that melatonin reduced corneal injury in a streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat model. In an ischemia induced model, melatonin blocks apoptosis in cultured human retinal pigment epithelium (RPE) cells ¹⁷. In addition to the potent antioxidant property of melatonin by itself, some of its metabolites are themselves direct free radical scavengers ^{18, 19}, increasing in that way the melatonin antioxidant capacity. Besides that, melatonin stimulates several

antioxidant enzymes including superoxide dismutase and glutathione peroxidase ^{15, 20}.

In some pathologies like diabetes mellitus, the hyperglycaemia increases enzymatic conversion of glucose to the polyalcohol sorbitol, with concomitant decreases in nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and glutathione ¹⁶. The rise of oxidative stress due to increased production of reactive oxygen species (ROS) combined with diminished antioxidative melatonin protection may possibly play a role in the development of diabetic retinopathy ²¹, a frequent complication of diabetes.

Considering the essential function of melatonin on retinal physiology and the functional inter-relationship between insulin and melatonin ²²⁻²⁵, we investigated the diurnal profile of retinal melatonin content and AANAT activity in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats.

To the best of our knowledge this is the first evidence for decreased melatonin production in retinas of STZ-induced diabetic rats.

Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats weighing 240–280g were obtained from the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. The animals were kept under a 12h:12h light/dark cycle (lights on at 06:00am, ZT 0), in a temperature controlled room (21±2°C), with food and water *ad libitum*. Ethics approval was granted for this study by the Committee of Ethics in Animal Experimentation of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil and it is

in agreement to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

Experimental design and STZ-induced diabetes

For all experiments the animals were divided into three groups: control, untreated diabetic and insulin-treated diabetic group. Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) (STZ - 60 mg/kg body weight) freshly diluted in citrate buffer (10 mmol/L, Na citrate, pH 4.5). Nondiabetic control rats were injected with citrate buffer in the same volume. All the injections were performed during light time. Body weight and glycaemia were measured before and after the intraperitoneal injection. Tail blood was collected for glucose determination using a glucometer (Optium Xceed[®] Medisense[®], United Kingdom). Animals with glycaemia > 200mg/dl were considered diabetic and included in the experimental group. Insulin-treated diabetic (INS-treated diabetic) animals received subcutaneous long action insulin 2 U (Glargina/Lantus[®] Sanofi-aventis, France) in the beginning of the day and regular insulin 2 U (Humulin R/Lilly, USA) plus long action insulin 2 U (Glargina/Lantus[®] Sanofi-aventis, France) in the beginning of the night for three days, beginning 1 day after the diabetes induction.

The effects of diabetes on retinal melatonin synthesis were evaluated 3 days after streptozotocin or citrate buffer injection. Independent groups of control, streptozotocin-induced diabetic and INS-treated diabetic animals were sacrificed every 3 hours throughout the 24 h light-dark cycle for the analysis of retinal melatonin content and AANAT activity.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Pinealectomy

To verify if circulating melatonin levels influence the amount of retinal melatonin we performed pinealectomy (PINX) as previously described²⁶. Control and PINX animals were sacrificed during dark period after 30 days of surgery.

Melatonin levels measurement

Retinal melatonin levels were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection running Empower software (Waters System, Milford, MA, USA)²⁷. Melatonin was separated on a Resolve C18 column (5 µm, 150 x 3.9 mm). The chromatographic system was isocratically operated with the following mobile phase: 0.1 M sodium acetate, 0.1 M citric acid, 0.15 mM EDTA, 35% methanol, pH 3.7, at a flow rate of 1 mL/min. The electrochemical detector potential was adjusted to +900 mV. The elution time for melatonin was about 6 min. Each retina was sonicated (Microson XL 2005, Heat System Inc., Farmingdale, NY, USA) in a solution of 0.1 M perchloric acid (120 µL), containing 0.02% EDTA and 0.02% sodium bisulfate. After centrifugation (2 min, 13000 g, Eppendorf 5415C Centrifuge, Brinkman Instruments Inc., Westbury, NY, USA), 40 µL of the supernatant was injected into the chromatographic system (Injector Mod. 7125, 20 µL loop, Rheodyne Inc., San Francisco, CA, USA).

AANAT activity determination

AANAT activity was measured by a radiometric assay^{28, 29}. Briefly, 100 µl of 0.1M sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing 40 mM tryptamine and [3H]- acetyl coenzyme A (2 mM, final specific activity = 4 mCi/ mmol - Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) were added to a microcentrifuge tube containing one gland kept at

4 °C. The retinas were sonicated and then incubated at 37 °C for 20 min. The reaction product *N*-³[H]-acetyltryptamine was extracted with chloroform (1 ml). Samples of 500 µl were evaporated until dry in a scintillation vial and radioactivity was determined with a Tri-Carb 2100 Packard β counter (GMI Inc, USA).

Cell viability and DNA fragmentation

Retinas obtained from non-diabetic and diabetic rats sacrificed by decapitation were dissected out, transferred to a phosphate buffer solution and incubated for 20 min at 37 °C with 0.25% trypsin-EDTA (Gibco). Enzymatic digestion was ceased by the addition of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Cultilab, Campinas, SP, Brazil) containing 10 IU/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin, 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine and 25 mM glucose. Tissue was mechanically dissociated with a micropipette, and cells were evaluated as describe below.

Rat retina cells were washed and suspended in PBS. Afterwards, 50 µL of propidium iodide solution (50 mg/ml in PBS) was added and the cells were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Juan, USA). Fluorescence was measured using the FL2 channel (orange-red fluorescence; 585/42 nm). Ten thousand events were analyzed per experiment. Cells with propidium iodide fluorescence were then evaluated by using the Cell Quest software (Becton Dickinson). DNA fragmentation was calculated after DNA staining with propidium iodide according to the method previously described³⁰. The pellet was gently resuspended in 300 µl hypotonic solution containing 50 mg/ml propidium iodide, 0.1% sodium citrate and 0.1% Triton X-100. The cells were then incubated for 1 h at room temperature. Fluorescence was measured and analyzed as described above.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Statistics

All the results were plotted as mean ± SEM. One-way ANOVA, two-way ANOVA with Bonferroni's post test, or Student t-test were used when appropriate. All statistical tests and graphics were done using GraphPad Prism version 5.01 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

For Review Only

Results

Blood glucose concentration

The STZ-induced diabetic condition was well established in our rats, as can be evaluated by the high blood glucose concentrations observed in the induced animals. The insulin treatment was capable to restore the blood glucose concentration to control levels (Figure 1).

Cell viability and DNA fragmentation

The flow cytometer results showed that 3 days of STZ-induced diabetic condition did not cause retinal cell necrosis (viability test) or retinal cell apoptosis (DNA fragmentation test) when compared to control group values (Figure 2).

Daily retinal melatonin profile after 3 days of streptozotocin-induced diabetes

As expected, retinas of control animals showed a clear melatonin synthesis daily rhythm with high levels during the night and low levels during the day period (Figure 3). In the retinas of diabetic rats the melatonin level was reduced at ZT18 ($p < 0.01$) and ZT21 ($p < 0.05$) related to control (Figure 3). On the other hand, immediate insulin treatment prevented melatonin reduction since no statistic significance was found between controls and Ins-treated diabetic animals after 3 days of treatment (Figure 3).

Retinal melatonin from pinealectomized (PINX) and intact animals

As can be observed in figure 4, there is no difference in the retinal melatonin content of PINX and intact animals. It leads us to conclude that pineal melatonin does not influence the amount of retinal melatonin in rats.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Daily AANAT activity profile after 3 days of streptozotocin-induced diabetes

In an attempt to investigate why retinal melatonin is reduced in diabetic rats we analyzed the daily AANAT activity profile. The AANAT activity of the control group presented higher values in the dark period at ZT15 ($p < 0.01$) and lower levels in the light period at ZT6 ($p < 0.01$) in comparison to the diabetic group (Figure 5). On the other hand, the retinal AANAT activity daily fluctuation that was abolished in STZ-induced diabetic rats was completely restored in the insulin-treated group.

For Review Only

Discussion and conclusion

Several studies have shown the protector properties of melatonin in retinas of diabetic STZ-induced rats^{14, 16, 31}. Our work is the first one to show the effects of diabetes, induced by streptozotocin, on retinal melatonin synthesis.

Initially, the cellular viability and DNA fragmentation of retinas from control and diabetic groups did not show any significant statistical difference. Park SH³² showed, in a STZ diabetes-induced model, degenerative changes from 1 week onwards in postsynaptic processes of horizontal cells in the deep invaginations of the photoreceptors cell layer, where melatonin synthesis takes place. The same author reported photoreceptor cells apoptosis after 4 weeks of disease. Consequently, according to our results we can exclude any type of retinopathy in our diabetes-induced model because three days of diabetes condition were not enough to cause apoptosis or necrosis.

The circadian profile of retinal melatonin content in the control group observed in our data corroborates with Tosini and Menaker¹. On the other hand, we have showed a 40% reduction on the nocturnal retinal melatonin content on the STZ-induced diabetic group in comparison to the control group. Moreover, the reduction in the retinal AANAT activity was correspondent to the reduced melatonin synthesis. Additionally, when animals promptly had their diabetes condition treated by the administration of insulin, we have found a complete reestablishment of the melatonin profile.

There is no information in the literature about retinal melatonin synthesis in diabetic rats; the available data concerns pineal melatonin synthesis in different diabetes models. In accordance to our retina results, some authors described a significant reduction of pineal melatonin synthesis in diabetic rats induced by alloxan

or STZ ^{33, 34} (Amaral FG, 2009 - unpublished data) as well as in hamsters ^{35, 36}. Decreased plasma melatonin levels were found in type 1 diabetic patients ^{37, 38}, in type 2 diabetic patients and in type 2 diabetic rats ³⁹.

In an attempt to elucidate if the reduced plasma melatonin content observed in diabetic rats would explain the reduced levels of retinal melatonin in our diabetic animals, we analyzed the retinal melatonin content in pinealectomized rats compared to control ones. No difference was found between the groups, so it is possible to conclude that the melatonin measured in the retina is exclusively from retinal origin. In this regard, the melatonin reduction found in the diabetic group retinas is most probably due to a retinal impaired intrinsic mechanism of melatonin synthesis that lead us to proceed the analysis of retinal AANAT activity.

Considering the AANAT activity profile in the retinas, our result is in agreement with Niki and colleagues ⁶, who showed the circadian pattern of this enzyme activity. Diabetic STZ-induced rats showed the loss of AANAT activity rhythmicity, which was partially re-established in insulin treated animals. Although insulin treatment did not totally recover the control AANAT activity pattern, the melatonin content results show that insulin reposition was able to recover not only the retinal melatonin level but also the rhythmic pattern that is observed in control rats. Thus, the AANAT activity peak found at ZT 15 supports the melatonin synthesis peaks observed at ZTs 18 and 21 in Ins-treated animals. Reinforcing our data Lynch, Eng e Wurtman ⁴⁰ showed that insulin was able to increase pineal AANAT activity and consequently melatonin plasmatic levels. The same was observed by Peschke et al. ³⁹ in Goto Kakizaki, spontaneous diabetic rats. Moreover, Garcia et al. ²⁴ and Peliciari-Garcia et al. ²⁵ demonstrated, in vitro, that insulin is able to potentiate the norepinephrine-induced melatonin synthesis in the pineal gland via PI3K signaling.

1
2
3 More studies are necessary to clarify the mechanisms of how the decreased
4 insulin and consequent hyperglycemia act impairing the melatonin synthesis in the
5 retina. At the moment we can suggest that the diabetic rats retinas are more
6 susceptible to the damage resulting from diabetic condition that involves the
7 decrease of the antioxidant protection due to the diminished melatonin production.
8
9
10
11
12
13
14

15 We can conclude that melatonin synthesis reduction observed in the pineal
16 gland of SZT-induced diabetic rats is also observed in a local melatonin tissue-
17 specific synthesizer, the retina. This impairment could compromise the physiological
18 homeostasis in the retina where melatonin plays an important role modulating
19 circadian functions.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgments

The authors thank Julieta Helena Scialfa for technical support.

For Review Only

Legends

Figure 1. Blood glucose concentration of control, diabetic and INS-treated diabetic rats. $n=27$, $***p < 0,0001$ vs control and vs INS-treated diabetic.

Figure 2. Cell viability (A) and DNA fragmentation (B) after 3 days of STZ-induced diabetic condition. $n=10$ control and $n=6$ diabetic plotted as mean $\pm$ SEM.

Figure 3. Daily retinal melatonin profile. Retinas were collected every 3 hours throughout the light-dark cycle after 3 days of streptozotocin-induced diabetes. $n=12$ control, $n=12$ diabetic and $n=3$ INS-treated diabetic retinas per time point. Two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons posttest, $**p < 0.01$ $*p < 0.05$ vs diabetic, plotted as mean $\pm$ SEM.

Figure 4. Retinal melatonin from PINX and intact control animals. $n=16$ plotted as mean $\pm$ SEM.

Figure 5. Daily retinal AANAT activity profile. Retinas were collected every 3 hours throughout the light-dark cycle after 3 days of streptozotocin-induced diabetes. $n=12$ controls, $n=12$ diabetic and $n=3$ INS-treated diabetic rat retinas per time point. Two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons posttest, $***p < 0.01$ vs control, $**p < 0.01$ vs diabetic, $*p < 0.05$ vs control and diabetic, plotted as mean $\pm$ SEM.

Figures

Figure 1.

Figure 2.

Figure 3 .

Figure 4 .

Figure 5 .

References

1. Tosini G, Menaker M. The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res* 1998;789:221-228.
2. Pang SF, Yu HS, Suen HC, Brown GM. Melatonin in the retina of rats: a diurnal rhythm. *J Endocrinol* 1980;87:89-93.
3. Green CB, Besharse JC. Retinal circadian clocks and control of retinal physiology. *J Biol Rhythms* 2004;19:91-102.
4. Sakamoto K, Ishida N. Circadian expression of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the rat retina. *Neurosci Lett* 1998;245:113-116.
5. Fukuhara C, Liu C, Ivanova TN, et al. Gating of the cAMP signaling cascade and melatonin synthesis by the circadian clock in mammalian retina. *J Neurosci* 2004;24:1803-1811.
6. Niki T, Hamada T, Ohtomi M, et al. The localization of the site of arylalkylamine N-acetyltransferase circadian expression in the photoreceptor cells of mammalian retina. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248:115-120.
7. LaVail MM. Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science* 1976;194:1071-1074.
8. Walker JA, Olton DS. Circadian rhythm of luminance detectability in the rat. *Physiol Behav* 1979;23:17-21.
9. Doyle SE, McIvor WE, Menaker M. Circadian rhythmicity in dopamine content of mammalian retina: role of the photoreceptors. *J Neurochem* 2002;83:211-219.
10. Brandenburg J, Bobbert AC, Eggelmeyer F. Circadian changes in the response of the rabbits retina to flashes. *Behav Brain Res* 1983;7:113-123.
11. Dmitriev AV, Mangel SC. Circadian clock regulation of pH in the rabbit retina. *J Neurosci* 2001;21:2897-2902.

12. Boyd TA, McLeod LE. Circadian Rhythms of Plasma Corticoid Levels, Intraocular Pressure and Aqueous Outflow Facility in Normal and Glaucomatous Eyes. *Ann N Y Acad Sci* 1964;117:597-613.
13. Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, et al. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. *Biol Signals Recept* 1999;8:56-63.
14. Baydas G, Tuzcu M, Yasar A, Baydas B. Early changes in glial reactivity and lipid peroxidation in diabetic rat retina: effects of melatonin. *Acta Diabetol* 2004;41:123-128.
15. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 2001;939:200-215.
16. Gul M, Emre S, Esrefoglu M, Vard N. Protective effects of melatonin and aminoguanidine on the cornea in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cornea* 2008;27:795-801.
17. Osborne NN, Nash MS, Wood JP. Melatonin counteracts ischemia-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:2374-2383.
18. Silva SO, Rodrigues MR, Carvalho SR, Catalani LH, Campa A, Ximenes VF. Oxidation of melatonin and its catabolites, N1-acetyl-N2 -formyl-5-methoxykynuramine and N1-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. *J Pineal Res* 2004;37:171-175.
19. Guenther AL, Schmidt SI, Laatsch H, et al. Reactions of the melatonin metabolite AMK (N1-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *J Pineal Res* 2005;39:251-260.
20. Baydas G, Ercel E, Canatan H, Donder E, Akyol A. Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure. *Cell Biochem Funct* 2001;19:37-41.
21. Obrosova IG, Fathallah L, Greene DA. Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: effect of DL-alpha-lipoic acid. *Eur J Pharmacol* 2000;398:139-146.

22. Lima FB, Machado UF, Bartol I, et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am J Physiol* 1998;275:E934-941.
23. Anhe GF, Caperuto LC, Pereira-Da-Silva M, et al. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. *J Neurochem* 2004;90:559-566.
24. Garcia RA, Afeche SC, Scialfa JH, et al. Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. *Life Sci* 2008;82:108-114.
25. Peliciari-Garcia RA, Marcal AC, Silva JA, et al. Insulin temporal sensitivity and its signaling pathway in the rat pineal gland. *Life Sci* 2010;87:169-174.
26. Martins E, Jr., Fernandes LC, Bartol I, Cipolla-Neto J, Costa Rosa LF. The effect of melatonin chronic treatment upon macrophage and lymphocyte metabolism and function in Walker-256 tumour-bearing rats. *J Neuroimmunol* 1998;82:81-89.
27. Cipolla-Neto J, Bartol I, Seraphim PM, Afeche SC, Scialfa JH, Peracoli AM. The effects of lesions of the thalamic intergeniculate leaflet on the pineal metabolism. *Brain Res* 1995;691:133-141.
28. Parfitt A, Weller JL, Klein DC, Sakai KK, Marks BH. Blockade by ouabain or elevated potassium ion concentration of the adrenergic and adenosine cyclic 3',5'-monophosphate-induced stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Mol Pharmacol* 1975;11:241-255.
29. Deguchi T, Axelrod J. Sensitive assay for serotonin N-acetyltransferase activity in rat pineal. *Anal Biochem* 1972;50:174-179.
30. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991;139:271-279.
31. Colantuoni A, Longoni B, Marchiafava PL. Retinal photoreceptors of Syrian hamsters undergo oxidative stress during streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2002;45:121-124.
32. Park SH, Park JW, Park SJ, et al. Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia* 2003;46:1260-1268.

33. Pang SF, Tang F, Tang PL. Alloxan-induced diabetes and the pineal gland: differential effects on the levels of pineal N-acetylserotonin, pineal melatonin, and serum melatonin. *J Pineal Res* 1985;2:79-85.
34. Stebelova K, Herichova I, Zeman M. Diabetes induces changes in melatonin concentrations in peripheral tissues of rat. *Neuro Endocrinol Lett* 2007;28:159-165.
35. Champney TH, Brainard GC, Richardson BA, Reiter RJ. Experimentally-induced diabetes reduces nocturnal pineal melatonin content in the Syrian hamster. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1983;76:199-201.
36. Champney TH, Holtorf AP, Craft CM, Reiter RJ. Hormonal modulation of pineal melatonin synthesis in rats and Syrian hamsters: effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin injections. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1986;83:391-395.
37. O'Brien IA, Lewin IG, O'Hare JP, Arendt J, Corrall RJ. Abnormal circadian rhythm of melatonin in diabetic autonomic neuropathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1986;24:359-364.
38. Tutuncu NB, Batur MK, Yildirim A, et al. Melatonin levels decrease in type 2 diabetic patients with cardiac autonomic neuropathy. *J Pineal Res* 2005;39:43-49.
39. Peschke E, Frese T, Chankiewicz E, et al. Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res* 2006;40:135-143.
40. Lynch HJ, Eng JP, Wurtman RJ. Control of pineal indole biosynthesis by changes in sympathetic tone caused by factors other than environmental lighting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973;70:1704-1707.