

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

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 proteossomal, 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.

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).

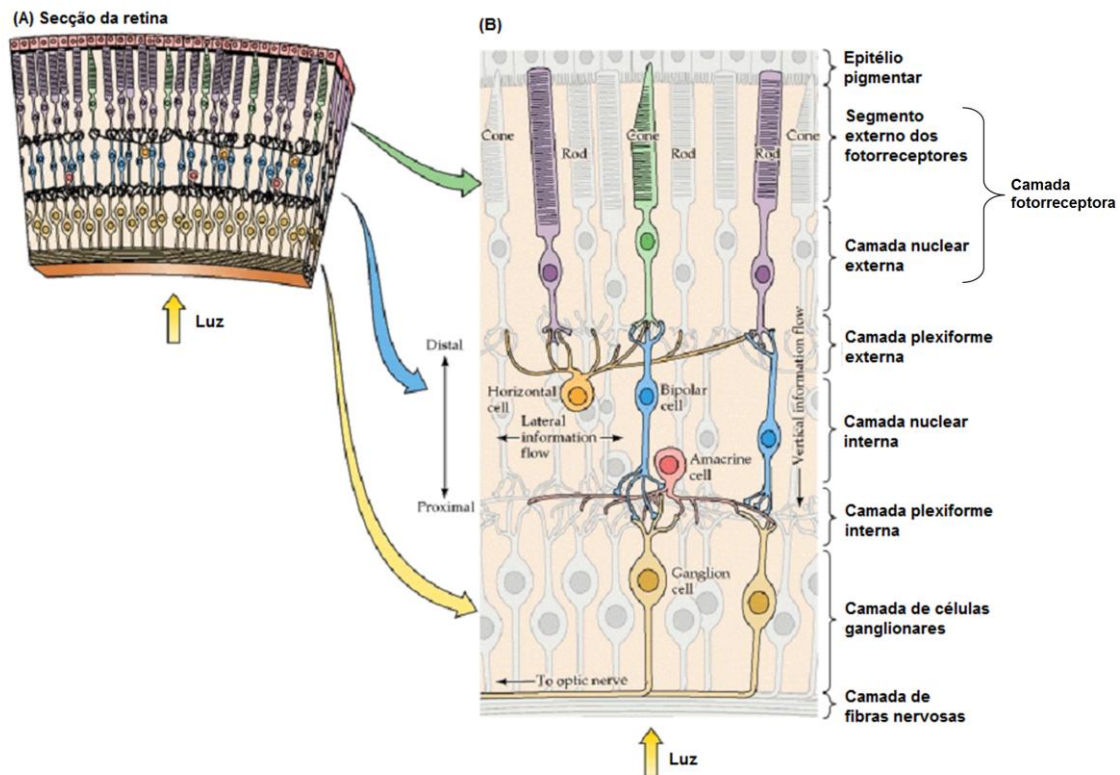


Figura 1. Estrutura da retina. (A) Secção da retina: visão geral das camadas da retina. (B) Diagrama da circuitaria básica da retina. As células fotorreceptoras, bipolares e ganglionares provêm uma rota direta na transmissão da informação visual para o cérebro. As células horizontais e amacrinas medeiam 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.

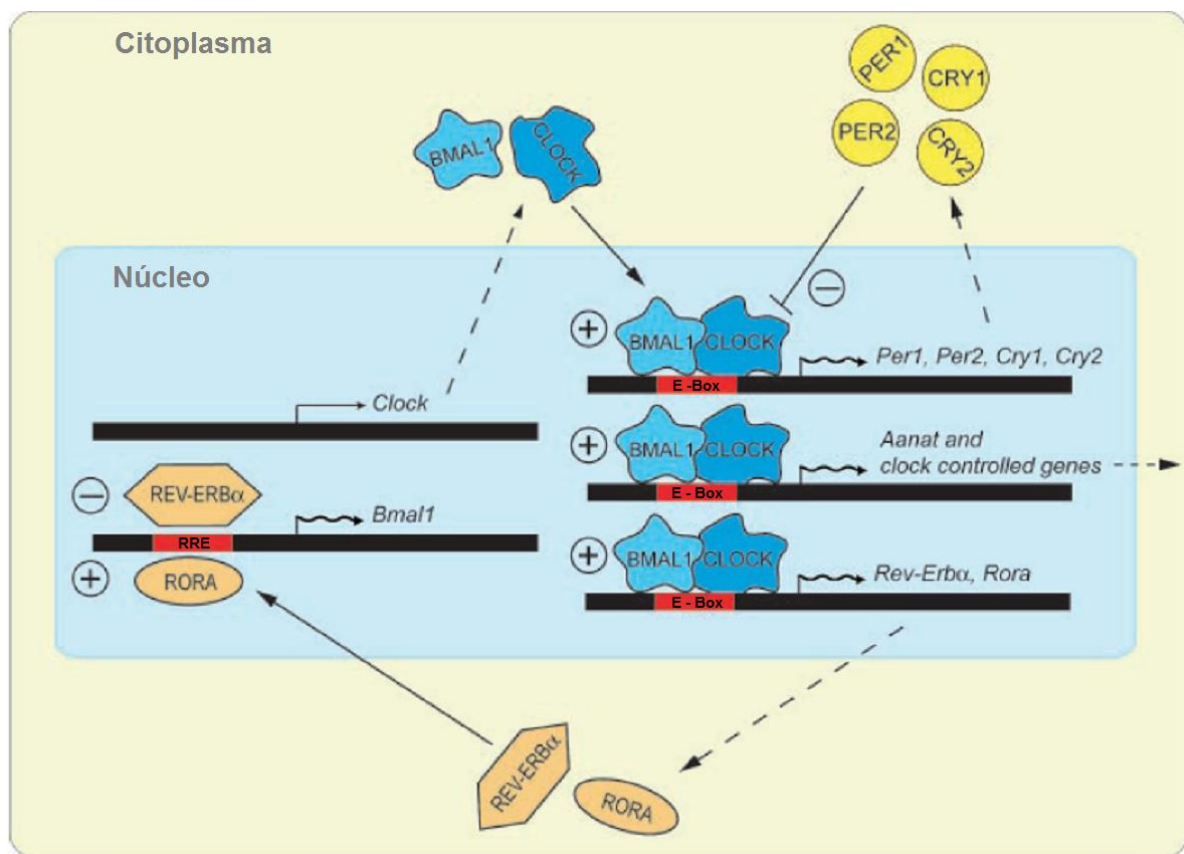


Figura 2. O mecanismo molecular do relógio circadiano é composto por duas alças de retroalimentação. A alça de retroalimentação positiva envolve as proteínas CLOCK e BMAL1, que se heterodimerizam e ativam a transcrição dos genes *Per* e *Cry*, e genes controlados pelo relógio. No citoplasma as proteínas 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).

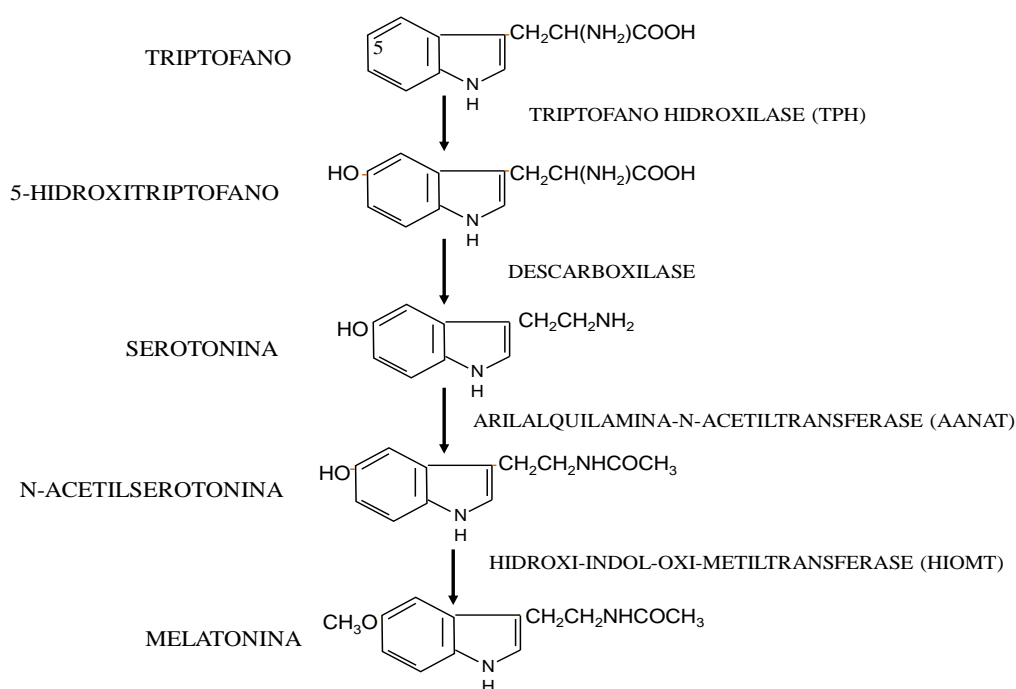


Figura 3. Via metabólica de síntese da melatonina.
 Fonte: Adaptado de Cipolla-Neto e Afeche (2008).

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).

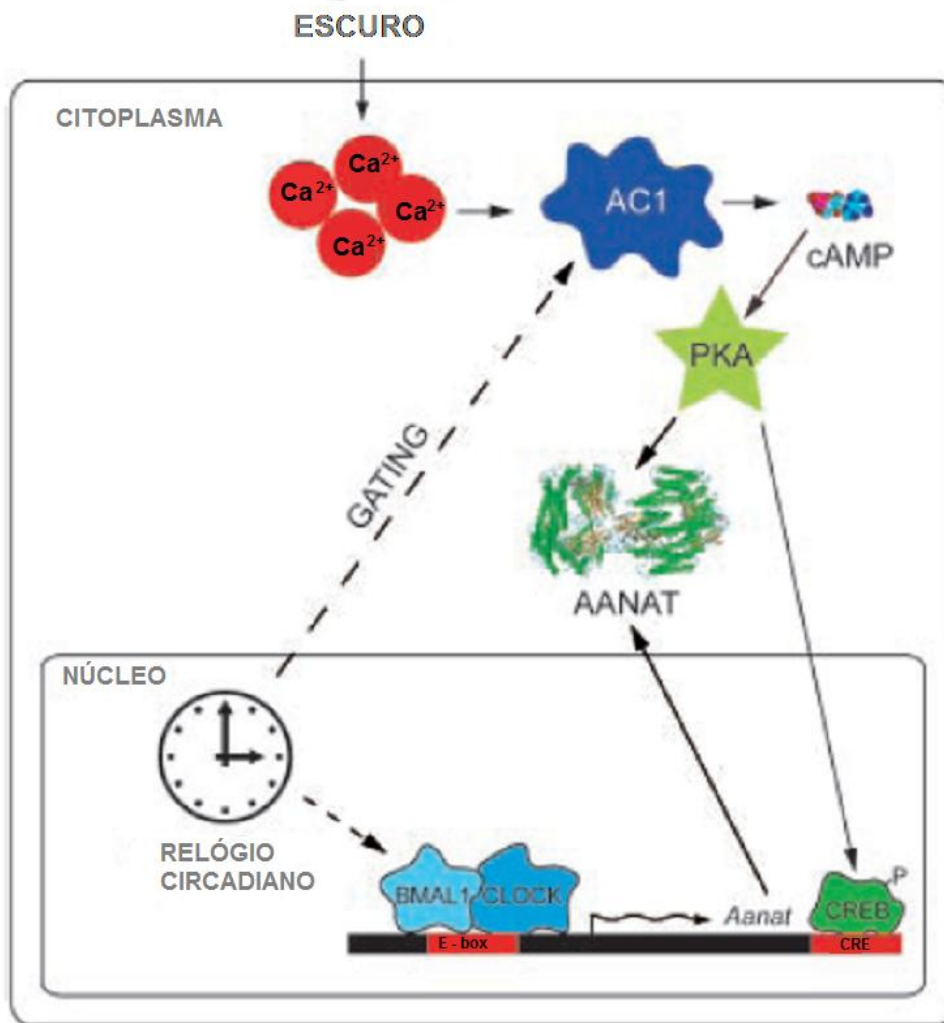


Figura 4. Mecanismo pelo qual o relógio circadiano regula a expressão rítmica do gene *Aanat*.
 Fonte: Adaptado de Tosini et al. (2008).

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 retinopias, nefropias, neuropias 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 conseqüências, 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 conseqüências 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 conseqüência, 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).

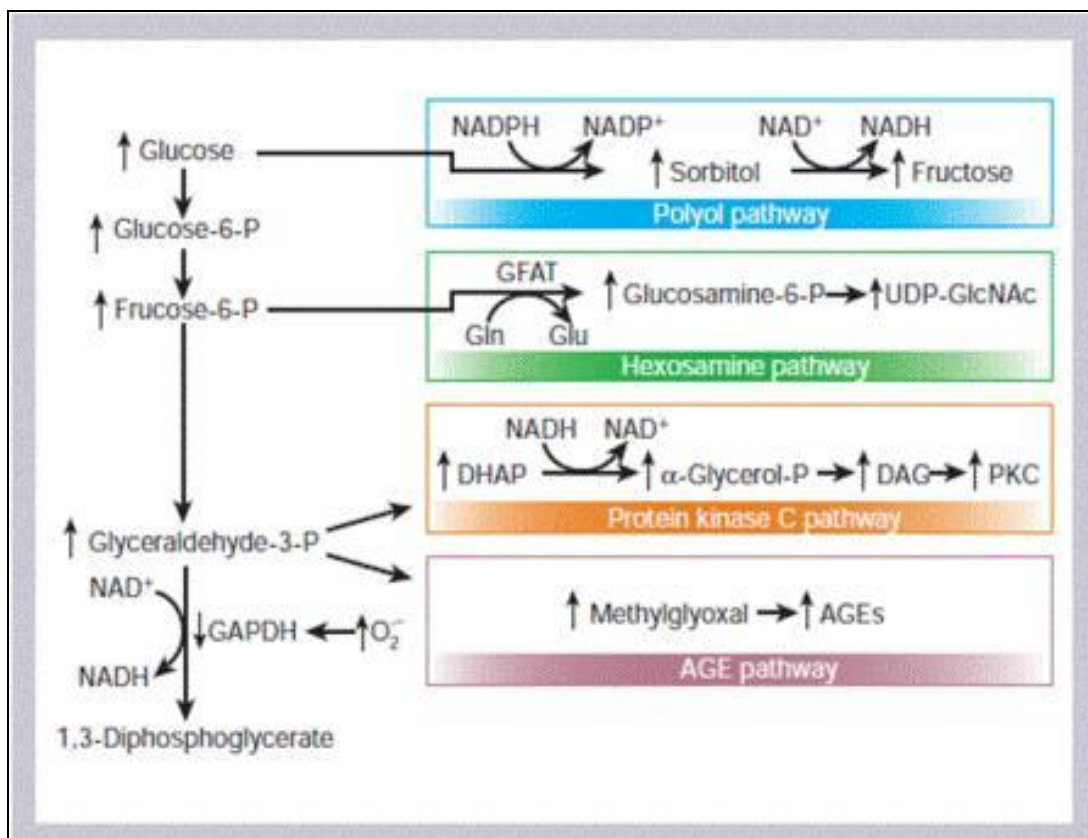


Figura 5. Provável mecanismo pelo qual a produção excessiva de superóxido (O_2^-) pela mitocôndria, induzido pela hiperglicemia, ativa as 4 vias responsáveis pelas complicações diabéticas. O excesso de O_2^- inibe a enzima GAPDH, portanto todos os metabólitos da glicólise são desviados para as vias responsáveis 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 metilglioal, 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 glutathiona 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 Ullrich, 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 fotoativação 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 sanguíneos, 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.

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:

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, Pfrieger 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.