

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIEGO JOSÉ SCHEBELSKI

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CILOSTAZOL NA RETINOPATIA DIABÉTICA EM  
RATOS

PONTA GROSSA

2019

DIEGO JOSÉ SCHEBELSKI

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CILOSTAZOL NA RETINOPATIA DIABÉTICA EM  
RATOS

Dissertação para apresentação no  
programa de Mestrado Interdisciplinar  
em ciências da Saúde da Universidade  
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Ricardo Gomes Zanetti

PONTA GROSSA

2019

S314 Schebelski, Diego José  
Avaliação do efeito do cilostazol na retinopatia diabética em ratos. / Diego José Schebelski. Ponta Grossa, 2019.  
35 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Zanetti Gomes.

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.

1. Diabetes. 2. Retinopatia diabética. 3. Cilostazol. 4. Retina. 5. Células ganglionares. I. Gomes, Ricardo Zanetti. II. Artoni, Roberto Ferreira. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atenção Interdisciplinar em Saúde. IV.T.

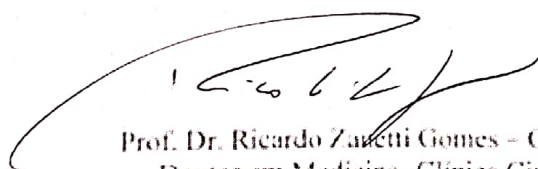
CDD: 616.462

DIEGO JOSÉ SCHEBELSKI

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CILOSTAZOL NA RETINOPATIA  
DIABÉTICA EM RATO

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na  
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

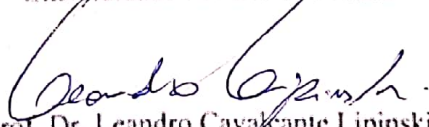
Ponta Grossa, 24 de maio de 2019.



Prof. Dr. Ricardo Zucetti Gomes - Orientador  
Doutor em Medicina- Clínica Cirúrgica  
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Carlos Augusto Moreira Junior  
Doutora em Medicina  
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski  
Doutor em Clínica Veterinária  
Universidade Estadual do Paraná

## RESUMO

A retinopatia diabética é uma das principais complicações da diabetes mellitus. Não existe tratamento para retinopatia diabética inicial, apenas controle da glicemia e controle de comorbidades. O cilostazol é uma possível alternativa terapêutica. Essa pesquisa teve o objetivo de avaliar o efeito protetor do cilostazol administrado por gavagem no desenvolvimento e evolução de retinopatia diabética em ratos com indução de diabetes mellitus por estreptozotocina intraperitoneal. Foram comparados 4 grupos de 15 animais por 8 semanas. Em dois grupos foi administrado estreptozotocina intraperitoneal para indução de diabetes mellitus e dois grupos foram mantidos normoglicêmicos para controle. Após confirmação da hiperglicemia nesses grupos, um grupo de rato diabético e um grupo sem diabetes passou a receber cilostazol oral (30mg/dia) por 8 semanas. Após o período de tratamento os olhos foram removidos e um deles foi destinado para análise histológica. Foram comparadas as espessuras e a contagem de núcleos das camadas da retina. O grupo de ratos diabéticos tratados com cilostazol oral (média de  $3 \pm 1$  núcleos em  $50 \mu\text{m}$  de retina) teve perda estatisticamente menor ( $p < 0,05$ ) de células ganglionares em relação ao grupo de ratos diabéticos não tratados com cilostazol (média de  $4 \pm 0$  núcleos em  $50 \mu\text{m}$  de retina). E ainda, o restante das análises sugeriu um efeito neuroprotetor do cilostazol em outras camadas da retina. Esse resultado aponta o cilostazol com uma possível opção terapêutica para retinopatia diabética e outras doenças neurodegenerativas da retina.

Palavras-chave: Diabetes, Retinopatia Diabética, Cilostazol.

## ABSTRACT

Diabetic retinopathy is one of the main complications of diabetes mellitus. There is no treatment for early diabetic retinopathy, only glycemic control and comorbid control. Cilostazol is a possible therapeutic alternative. The purpose of this research was evaluate the protective effect of cilostazol administered by gavage on the development and evolution of diabetic retinopathy in rats inducing diabetes mellitus by intraperitoneal streptozotocin. Four groups of 15 animals were compared for 8 weeks. In two groups intraperitoneal streptozotocin was given for induction of diabetes mellitus .And two groups were maintained normoglycemic for control. After confirmation of hyperglycemia in these groups, one group of diabetic mice and one group without diabetes received oral cilostazol (30mg / day) for 8 weeks. After the treatment period the eyes were removed and one of them was intended for histological analysis. The thickness and core count of the retinal layers were compared. The group of diabetic rats treated with oral cilostazol (mean  $3 \pm 1$  nuclei in 50  $\mu\text{m}$  retinal) had a statistically lower ( $p < .05$ ) loss of ganglion cells compared to the group of diabetic rats not treated with cilostazol (mean  $4 \pm 0$  nuclei in 50  $\mu\text{m}$  of retina). Furthermore, the remainder of the analyzes suggested a neuroprotective effect of cilostazol on other layers of the retina. This result points to cilostazol with a possible therapeutic option for diabetic retinopathy and other neurodegenerative diseases of the retina.

Keywords: Diabetes, diabetic retinopathy, cilostazol.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupos do experimento.....	22
Tabela 2	Média e desvio padrão da análise morfométrica da retina dos grupos.....	26
Tabela 3	Comparação estatística da análise morfométrica entre os grupos.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS

DM	Dibetes Mellitus
RD	Retinopatia diabética
RDNP	Retinopatia diabética não proliferativa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
IL 1b	Interleucina 1 Beta
IL 6	Interleucina 6
TNF-a	Fator de necrose tumoral alfa
PDE3	Fosfodiesterase 3
AIT	Ataque isquêmico transitório
FDA	Food and Drug Administration
PDE 3	Fosfodiesterase 3
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ADP	Adenosina difostato de adesão intercelular
ICAM	Moléculas de adesão intercellular
BCL2	Gene Célula-B de linfoma 2
BAX	Gene BAX – associado a BCL2



## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	11
2.1 OBJETIVO GERAL .....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
3.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA RETINA .....	12
3.2 RETINOPATIA DIABÉTICA .....	13
3.3 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DA RETINOPATIA DIABÉTICA .....	13
3.4 INFLAMAÇÃO NA RETINOPATIA DIABÉTICA .....	14
3.5 CILOSTAZOL .....	16
3.5.1 Mecanismo De Ação De Cilostazol .....	16
3.5.2 Atividade Antiplaquetária .....	17
3.5.3 Atividade Vasodilatadora .....	17
3.5.3 Ativação De Células Endoteliais .....	18
3.5 EFEITO ANTIPROLIFERATIVO .....	19
3.5.4 Atividade Neuroprotetora .....	19
3.5.5 Promover A Eliminação De Radicais Livres .....	20
3.5.6 Mobilização De Reserva De Gorduras .....	20
3.6 MODELO DE RATO DIABÉTICO .....	20
<b>4 MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	21
4.1 PREPARO DOS ANIMAIS .....	21
4.2 MODELO DE RATO HIPERGLICÊMICO .....	21
4.3 ADMINISTRAÇÃO DE CILOSTAZOL .....	22
4.4 REMOÇÃO DOS TECIDOS .....	22
4.5 ANÁLISE DAS CITOCINAS OCULARES .....	22
4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA RETINA .....	23
<b>5 RESULTADOS</b> .....	25
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	30
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31

## 1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus representa um grupo de desordens metabólicas heterogêneas que surge como resultado de hiperglicemia por déficit na secreção e/ou ação da insulina. Atualmente incluem-se na definição dois tipos de diabetes: tipo 1, resultante de destruição de células  $\beta$ -pancreáticas produtoras de insulina; e tipo 2, o qual resulta da resistência periférica à insulina (RAFEHI, H. et al 2011).

Leif Groop et al em 2018 propôs uma nova classificação da diabetes mellitus baseada em parâmetros laboratoriais, genéticos, detalhes da apresentação clínica e progressão da doença. Foram identificados cinco grupos de diabetes, sendo três formas graves e duas formas leves da doença: uma correspondendo ao DM tipo 1 e quatro representando subtipos do DM tipo 2.

Diabetes mellitus é uma doença pandêmica no mundo todo. Em 2014, estima-se que 422 milhões de pessoas viviam com diabetes mellitus em todo o mundo. A prevalência de diabetes estratificada por idade aumentou de 4,7% em 1980 para 8,7% na população adulta. É um dos problemas mais importantes da atualidade, por ser uma doença com elevada morbimortalidade (WHO 2016).

Estima-se que mais de 30 mil brasileiros sejam portadores de DM1 e que o Brasil ocupe o terceiro lugar em prevalência de DM1 no mundo, segundo a International Diabetes Federation (2015). Embora a prevalência de DM1 esteja aumentando, corresponde a apenas 5 a 10% de todos os casos de DM. É mais frequentemente diagnosticado em crianças, adolescentes e, em alguns casos, em adultos jovens, afetando igualmente homens e mulheres. O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) corresponde a 90 a 95% de todos os casos de DM. Possui etiologia complexa e multifatorial, envolvendo componentes genético e ambiental. Geralmente, o DM2 acomete indivíduos a partir da quarta década de vida, embora se descreva, em alguns países, aumento na sua incidência em crianças e jovens.

A Retinopatia diabética (RD) é uma das maiores causas de cegueira irreversível no mundo, sendo a principal entre as pessoas em idade produtiva, sendo considerada uma das complicações mais temidas pelos pacientes diabéticos. Estima-se que, após 15 anos de doença, 80% dos pacientes com DM tipo 2 e 97% de DM tipo 1 relatem um grau de retinopatia. (MENDANHA, D. et al 2016).

RD é uma complicação neurovascular específica do diabetes e tem um significativo impacto nos sistemas de saúde no mundo (Congdon, N., Zheng, Y., e He, M. 2012). Retinopatia diabética continua a ser uma das principais causas de perda de visão entre a população em idade ativa das regiões industrializadas. Em 2010, esta complicação afetou mais de 100 milhões de pacientes em todo o mundo e continua a crescer até atingir mais de 190 milhões em 2030 (LEASHER, J. L. 2016). O número de pessoas com deficiência visual devido a Retinopatia Diabética em todo o mundo está aumentando e apresentando um aumento na proporção de toda a cegueira ou causas de moderada e severa perda visual. Uma em cada 39 pessoas cegas apresenta cegueira devido a Retinopatia Diabética e 1 em cada 52 pessoas com deficiência visual apresentam deficiência visual devido a Retinopatia Diabética (LEASHER, J. et al, 2016).

A doença passa por um período assintomático no qual se deve proceder ao diagnóstico e ao tratamento com o objetivo de evitar alterações irreversíveis. As diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes recomendam exames periódicos e rastreamento de doenças oculares por médico oftalmologista, já que diagnóstico e tratamento precoces proporcionam melhores resultados visuais, menor custo econômico e social, além de melhor prognóstico em longo prazo.

Pacientes com diabetes desenvolvem um estado pró trombótico envolvendo disfunção endotelial, disfunção de plaquetas e coagulação debilitada (MINA, A. et al 2007; NATARAJAN, A. et al, 2008; SCHÄFER, A. et al 2008). RD é caracterizada por fechamento capilar e isquemia retiniana, seguido de crescimento de neovasos na retina e nervo óptico. Sangramento no vítreo e descolamento de retina secundário a tração vítreo-retiniana que levam a perda visual (MILLER, J. W.,1997).

O Fluxo sanguíneo retiniano encontra-se reduzido em paciente com retinopatia diabética quando comparado com pessoas sem diabetes (BURSELL, S. et al 1996). A não perfusão de capilares profundos está associado a disrupção dos fotorreceptores na maculopatia diabética isquêmica (SCARINCI, F. et al 2016). Muitos estudos realizados em pacientes diabéticos e em modelos de animais diabéticos têm mostrado que a hipóxia tecidual e imunodesregulação podem provocar a expressão progressiva de moléculas inflamatórias intravítrea, tais como citocinas, quimiocinas e outros fatores inflamatórios responsáveis pelo desenvolvimento de RD. Existem evidências de que a neuroinflamação e neurodegeneração desempenham um papel significativo na fisiopatologia da RD inicial. A melhoria da microcirculação na retina e na coróide pode ser um alvo terapêutico importante se associado a neuroproteção (SORRENTINO, F. S. et al 2016).

De acordo com o estágio da doença, o tratamento pode ser realizado com um ou mais dos seguintes métodos: fotocoagulação a laser, fármaco modulação com antiangiogênico, infusão intravítrea de medicamento anti-inflamatório, implante intravítreo de polímero farmacológico de liberação controlada e cirurgia vitreoretiniana. As Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes afirmam que não existem tratamentos oculares específicos para a RD inicial. Atualmente usamos a abordagem sistêmica para otimizar a glicose no sangue e pressão arterial para deter a progressão para estágios graves de RD e evitar a necessidade de tratamento ocular. Embora haja evidência do benefício do fenofibrato e tratamento com anti-VEGF intravítreo estas terapias não são o tratamento padrão existente para RDNP inicial (El RAMI, H. et al 2017).

O Cilostazol é uma possível alternativa terapêutica para o tratamento da RD. Ele é um inibidor seletivo da fosfodiesterase III com propriedade antiplaquetária, antitrombótica e vasodilatadora. Apresenta propriedades vasodilatadoras que diminuem a hipóxia, melhorando a isquemia as propriedades anti-inflamatórias reduzem a produção excessiva de vasos sanguíneos diminuindo a expressão de VEGF (CHUANG, J. L. T.; LEE, J. C. C. 2015). O tratamento com Cilostazol pode culminar na proteção das células ganglionares da retina por diminuir a isquemia causada pela diabetes, refletido por uma redução na liberação de VEGF (JUNG, K. I. et al 2013).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral desse trabalho é estudar os efeitos do cilostazol em ratos com retinopatia diabética não proliferativa.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos específicos desse trabalho são:

- 1) Comparar os níveis oculares de marcadores inflamatórios (VEGF, IL-1b, IL-6, TNF-a) entre os grupos de animais diabéticos e não diabéticos que terão administração ou não de cilostazol.
- 2) Analisar as células do tecido retiniano por histologia entre os grupos de animais diabéticos e não diabéticos que terão administração ou não de cilostazol.
- 3) Verificar se a administração de Cilostazol oral fará uma diminuição com significância estatística nos níveis oculares de fatores inflamatórios e se terá efeito neuroprotetor na retina.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA RETINA

Os neurônios da retina são organizados em três camadas de corpos celulares nervosos e duas camadas de sinapses (PAULUS, Y. M. et al 2018). A camada nuclear externa contém células fotorreceptoras de bastonetes e cones responsáveis pela fototransdução, e a camada nuclear interna contém corpos celulares de neurônios de segunda e terceira ordem, principalmente células bipolares, horizontais e amácrinas responsáveis pela transmissão de sinais visuais de fotorreceptores para o cérebro. A camada de células ganglionares contém corpos celulares de células ganglionares, células amácrinas deslocadas e astrócitos (MORAN, E. P. et al 2016).

Na retina humana, a vascularização ocorre pela artéria central da retina que se ramifica em quatro arteríolas intrarretinianas que se alimentam em um leito capilares. O leito capilar da retina é organizado em três camadas, os plexos vasculares superficiais, intermediários e profundos (PAULUS, Y. M. et al 2018). O fluxo sanguíneo retiniano é rigidamente regulado para compensar as condições fisiológicas variáveis e as alterações na atividade neuronal. A auto regulação da resistência vascular em ambas as arteríolas e capilares geralmente compensa as alterações na pressão arterial, gases sanguíneos ou pressão intra-ocular (KUR, J.; NEWMAN, E. A.; CHAN-LING, T. 2012). Acredita-se que as arteríolas sejam as principais responsáveis pela regulação do fluxo sanguíneo em resposta à atividade neuronal; Sob o estímulo visual, as arteríolas retinianas se dilatam em resposta à atividade neuronal localmente aumentada, assegurando que os neurônios que ativam ativamente tenham suprimento sanguíneo adequado (PAULUS, Y. M. et al 2018). Existem algumas evidências de que os capilares também podem desempenhar um papel, uma vez que as alterações reguladas pela atividade do fluxo sanguíneo retiniano são altamente localizadas na retina, sugerindo que os capilares também são capazes de responder às demandas neuronais (KUR, J.; NEWMAN, E. A.; CHAN-LING, T. 2012).

Neurônios da retina, glia, microglia e microvasculatura comunicam-se para formar a unidade neurovascular, que fornece a demanda metabólica para os sensíveis neurônios da retina com substratos suficientes de oxigênio e energia, recicla neurotransmissores e remove resíduos. Esta associação funcional e física é essencial para a função retiniana normal e permite que a retina neural se adapte a condições fisiológicas variáveis. No processo de acoplamento neurovascular, a atividade neuronal evoca reações localizadas, incluindo vasodilatação e

aumento do fluxo sanguíneo, para atender às demandas de energia da transmissão e transmissão do sinal neuronal (STEM, M. S.; GARDNER, T. W. 2013).

### 3.2 RETINOPATIA DIABÉTICA

Uma variedade de desequilíbrios metabólicos e vasculares mudanças, como espessamento da membrana basal, apoptose de pericitos e células endoteliais e difusamente aumento da permeabilidade vascular, ocorrem na retina em DM, muito antes do DR ser clinicamente reconhecido. Está bem estabelecido que a hiperglicemia é um importante fator de risco desenvolvimento e progressão da DR (KLEIN, C. J. L., et al 2018). A retina é um dos poucos tecidos, o que não requer insulina para transportar glicose para a célula. Em vez disso, o transportador de glicose-1 (Glut-1) facilita a glicose de entrada nas células da retina (SONE, H. et al 1997). Como consequência, a hiperglicemia leva a um alto nível intracelular de glicose e quando altera o potencial redox, aumenta a produção de sorbitol aldose redutase e altera as vias de transdução de sinal, tais como a ativação de diacilglicerol (DAG) e os níveis de proteína quinase C (PKC) (SCIENCES, M., et al 1998), (KOYA, D.; KING, G. L. 1998), levando a formação de radicais livres (estresse oxidativo), depleção de NADH e causando um estado de “pseudo-hipóxia” intracelular (Ido, Y. et al 1993). Outro efeito da hiperglicemia é a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) pelo mecanismo da glicação não enzimática de proteínas, que são encontradas aumentadas na retina diabética (STITT, A. W. et al 1997). Estes AGEs causam aumento do estresse oxidativo e subsequente morte celular. Pericitos, que são conhecidos por degenerar em um estágio inicial do DR pré-clínico, expressam o AGE receptor e, portanto, pode ser mais suscetível a efeitos nocivos dos AGEs. Provavelmente todos esses efeitos de glicemia juntos levam a uma perda gradual de células da retina. Existem muitas evidências disponíveis que a DM induz aumento da apoptose na retina (MIZUTANI, M.; KERN, T. S.; LORENZI, M. 1996).

### 3.3 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DA RETINOPATIA DIABÉTICA

O ambiente diabético é hostil aos vasos sanguíneos da retina, aos neurônios e a células da glia. Cria uma unidade neurovascular disfuncional tanto na DR precoce quanto na tardia. No início da DR não proliferativa, os vasos sanguíneos da retina e os neurônios degeneram, levando à hiperpermeabilidade vascular que pode resultar em edema macular. A degeneração dos vasos

sanguíneos da retina resulta em não perfusão retinal e isquemia, preparando o terreno para a neovascularização patológica (MORAN, E. P et al 2016).

Embora a RD tenha sido tradicionalmente considerada uma complicação diabética microvascular, estudos recentes sugerem que a neurodegeneração da retina precede a disfunção microvascular na RD e pode contribuir para anormalidades microvasculares (STEM, MS.; GARDNER, TW. 2013). Pacientes diabéticos sem lesões microvasculares clinicamente evidentes apresentam alteração na adaptação ao escuro, sensibilidade ao contraste e respostas ao eletrorretinograma (ERG), sugerindo que a retina neural já tenha começado a degenerar antes do desenvolvimento de lesões microvasculares (UMEGAKI, H. 2012). ERGs de pacientes diabéticos sugerem que a degeneração neuronal ocorre predominantemente na retina interna, e modelos animais de diabetes experimental corroboram esses achados (GUSTAVSSON, C. et al 2012; GONG, Y.; REN, Z. C. R. 2012).

Estresse neuronal e morte celular também levam à ativação glial, que ocorre precocemente no DR. A gliose aguda beneficia a retina estressada, uma vez que glia ativada e microglia fagocitam células apoptóticas, eliminam fragmentos e citotoxinas e secretam fatores neurotróficos. No entanto, a gliose crônica na DR é prejudicial aos vasos sanguíneos e neurônios da retina. A glia ativada pode não regular adequadamente o fluxo sanguíneo retiniano ou manter a barreira sangüínea e as células glióticas secretam citocinas inflamatórias, moléculas citotóxicas e fatores de crescimento vascular, perpetuando tanto a disfunção microvascular quanto a neurodegeneração (FERN, L. et al 2014).

### 3.4 INFLAMAÇÃO NA RETINOPATIA DIABÉTICA

Há muito se debate se a hiperglicemia ou qualquer distúrbio metabólico específico é necessário e suficiente para causar DR. Ao longo da última década tem havido maior apreciação do papel do sistema imune inato como uma resposta adaptativa à obesidade e diabetes (HOTAMISLIGIL, G. S. 2006; ODEGAARD, J. I.; CHAWLA, A. 2013). Nesse paradigma de excesso de nutrientes, como um alto nível de gordura ácidos, é detectado por células adiposas com liberação de mediadores pró-inflamatórios macrófagos, incluindo lipopolissacarídeo, interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e necrose tumoral fator alfa (TNF- $\alpha$ ), resultando em inflamação sistêmica e, em última análise, doença e câncer (STEM, M.S.; GARDNER, T.W. 2013).

Dentro da retina, as células endoteliais aumentam a expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e P-selectina no início do curso da diabetes, levando a aderência



leucocitária às paredes vasculares (MCLEOD, D. S. et al 1995). A leucocitose contribui para a ruptura da barreira sangue-retiniana e morte de células endoteliais, perpetuando uma cascata inflamatória dentro da retina. Uma questão importante é se a leucocitose também cria áreas de não perfusão capilar dentro da retina, que poderia privar o tecido neuronal de nutrientes essenciais e, assim, contribuir para neurodegeneração em DR (IYAMOTO, K. A. 1999). Também é possível que a degeneração das células neurosensoriais na periferia leva ou contribui para o fechamento vascular secundário dentro da retina. A seqüência exata de eventos que leva à leucocitose na DR ainda não está claramente definida, embora Huang et al 2010 mostraram que a ausência de TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória regulados positivamente durante o diabetes, previne a leucostase da retina e a apoptose de células neurais em ratos diabéticos. Esse achado sugere que o TNF- $\alpha$  pode desempenhar um papel crítico na progressão do DR e que a leucostase pode estar ligada à neurodegeneração na DR através de um mecanismo dependente de TNF.

Juntamente com o TNF- $\alpha$  (ZHOU, J. et al 2012), níveis vítreos de outras citocinas inflamatórias, como a MCP-1 (CARRASCO, E.; FRANCISCO, G. 2005), IL-6 (GUSTAVSSON, C. et al 2012), e IL-1 $\beta$  (ZHOU, J. et al 2012) estão aumentados em pacientes com DR em comparação com controles sem diabetes. A regulação positiva dessas ou outras citocinas pode contribuir para a ativação glial no início da DR, em que a microglia normalmente quiescente começa a secretar substâncias citotóxicas que contribuem para a morte celular neural. Ativação microglial em DR humana tem sido demonstrado por ZENG et al 2015, e inibir tal ativação das células gliais pode ser uma estratégia para prevenir a neurodegeneração em DR. Muito mais trabalho é necessário para definir papel adaptativo e mal-adaptativo da microglia nos distúrbios neurodegenerativos (AGUZZI A.; BARRES B.A.; B. M. 2015).

A relação entre leucostase e ativação glial no DR parece ser mediada por citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , mas a relação temporal entre esses eventos e o aumento da expressão de citocinas inflamatórias exigem maior exploração. Idealmente, as terapias destinadas a retardar a progressão da RD teriam como alvo os primeiros passos patogênicos, definindo assim a relação temporal entre a regulação positiva de citocinas, leucostase, e ativação das células gliais será fundamental para a elaboração de tratamentos prevenindo a neurodegeneração associada ao DR (STEM, M.S.; GARDNER, TW. 2013).

O VEGF, um modulador clássico do crescimento vascular, permeabilidade vascular, proliferação celular e com tempo de vida aumentado em RD (WITMER, A. N. et al 2003). O VEGF é expresso em células epiteliais pigmentares gliais, neuronais e da retina e é secretado em resposta a isquemia, jejum, estresse oxidativo, inflamação e outros estressores. O VEGF é

central para a hiperpermeabilidade vascular e neovascularização patológica. A ligação do VEGF ao VEGFR2 promove a fosforilação de proteínas da junção estreita para modular sua degradação e subsequente ruptura das junções estreitas endoteliais e da barreira sanguínea (KVANTA, A. et al 2015).

A superexpressão de VEGF ou a administração de peptídeo exógeno é suficiente para induzir neovascularização retinal e vasopermeabilidade, e a neutralização do VEGF temporariamente alivia DR e retinopatias relacionadas (MILLER, J. W. et al 2013). No entanto, a terapia anti-VEGF deve ser administrada através de injeção intravítrea frequente (até a cada 8 semanas) para tratar a retinopatia. Além disso, o VEGF modula a sinalização de sobrevivência nos vasos sanguíneos e neurônios da retina (FU, S. et al 2015), e o uso prolongado da terapia com anti-VEGF pode resultar em degeneração neuronal e vascular (KURIHARA, T. et al 2012).

### 3.5 CILOSTAZOL

#### 3.5.1 Mecanismo De Ação De Cilostazol

Cilostazol, um derivado da quinolinona e inibidor da PDE-3. Foi aprovado para claudicação intermitente desde 1999. Vários estudos randomizados e dados agrupados mostraram a superioridade do cilostazol sobre outros antiagregadores plaquetários em relação à prevenção secundária de acidente vascular cerebral ou AIT. Embora a droga não tenha sido aprovada pela FDA para o tratamento de derrame, dados indicam que este agente deve ser incorporado em recomendações futuras (GALYFOS, G.; SIANOU, A. 2017). Existem múltiplas isoformas de PDE. O cilostazol é principalmente seletivo para PDE-3. No entanto, também tem alguma ação sobre a PDE-5, uma enzima que é encontrada em concentrações mais elevadas em plaquetas e células sanguíneas. Esse medicamento atua aumentando o nível de AMPc intracelular e diminuindo a captação de adenosina, aumentando assim os níveis extracelulares de adenosina levando à vasodilatação e inibição plaquetária, uma propriedade que não é demonstrada por outros inibidores da PDE -3. Também previne a proliferação de células musculares lisas vasculares in vitro, reduz os níveis plasmáticos de triglicérides e aumenta os níveis de colesterol HDL ativando a lipase lipoprotéica, tornando-a uma droga útil não apenas na claudicação intermitente, mas na prevenção de aterosclerose e eventos isquêmicos secundários (LIU, Y. et al 2001).

### 3.5.2 Atividade Antiplaquetária

Ao aumentar o AMPc intracelular plaquetário o cilostazol inibe a agregação plaquetária “*in vitro*” provocada por uma ampla gama de estímulos químicos ou físicos: inibe a agregação induzida pelo ácido araquidônico, ADP, epinefrina, colagênio, trombina e cisalhamento. Constatou-se que o cilostazol inibe a formação de CD62P (P-selectina), uma proteína presente nas membranas de grânulos alfa das plaquetas. P-selectina é encontrada para desempenhar um papel no estado inflamatório e pró-trombogênico induzido por acidente vascular cerebral isquêmico / lesão de reperfusão (GOTO, S. 2006). Estudos em animais mostraram que o cilostazol previne eventos trombóticos, tais como embolia pulmonar e oclusão da artéria carótida interna. Ao contrário da aspirina, o cilostazol não prolongou o tempo de sangramento da pele e seu efeito antiplaquetário foi reversível. Assim, o cilostazol tem sido extensivamente usado no período perioperatório em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica, que foram submetidos à reconstrução vascular (LIU, Y. et al 2001), (GOTO, S. 2006). Agregação plaquetária induzida por cisalhamento é um dos mecanismos importantes na formação de aterosclerose, especialmente na área de trombo anterior ou em locais de bifurcação, e é inibida pelo cilostazol (NAKAMURA, T. et al 2007).

### 3.5.3 Atividade Vasodilatadora

O cilostazol apresenta efeitos vasodilatadores amplos, mas não uniformes, induzindo maior dilatação nas artérias vertebrais e femorais do que nas artérias renais (KIMURA Y. et al 1985). O tratamento com cilostazol aumentou o AMPc intracelular em células musculares lisas de artérias coronárias e mesentéricas de coelho e induziu vasodilatação nesses leitos vasculares (TANAKA, T. et al 1988). Em cães o cilostazol produziu o maior aumento do fluxo sanguíneo nas artérias vertebrais e femorais (KAWAMURA, K. et al 1985). E ainda, o cilostazol aumentou o fluxo sanguíneo médio do tornozelo nas extremidades ocluídas de pacientes japoneses (YASUDA, K. et al 1985).

### 3.5.3 Ativação De Células Endoteliais

A proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) é uma proteína encontrada nas células endoteliais vasculares. O desencadeamento desta proteína está envolvido no início da placa aterosclerótica. A MCP-1 é uma quimiocina pertencente às quimiocinas CC. Após uma lesão endotelial vascular, as células endoteliais são ativadas e irão secretar MCP-1, que é uma quimiocina específica para macrófagos e / ou monócitos. Além disso, a MCP-1 atrai células inflamatórias para migrar para o endotélio vascular lesionado. A MCP-1 interage com um receptor específico chamado CCR2 (receptor de quimiocina 2) encontrado na parede das células endoteliais para induzir uma reação inflamatória no endotélio vascular (EGASHIRA, S. K. 2002). Com base em experimentos realizados em células endoteliais da veia umbilical humana, verificou-se que o cilostazol aumenta os níveis de cAMP intracelular e modula a expressão da MCP-1 nas células endoteliais vasculares (GOTO, S. 2006).

A alta concentração de glicose no sangue aumenta a expressão de moléculas endoteliais vasculares principalmente através de vias de proteína quinase C que fazem com que os leucócitos polimorfonucleares aderirem ao endotélio vascular e causarem danos. Este mecanismo é um dos eventos iniciais na aterosclerose. Exemplos de tais moléculas são a molécula de adesão intercelular (ICAM), P-selectina e E-selectina. O cilostazol reduz as ações prejudiciais dos neutrófilos, diminuindo a expressão de ICAM e P-selectina (OMI, H. et al 2004).

I-CAM, P-selectina e E-selectina são moléculas de adesão vascular endotelial que interagem com células inflamatórias, principalmente neutrófilos, quando há uma lesão endotelial que pode ser induzida por alta concentração de glicose, níveis elevados de lipoproteína de baixa densidade, hipertensão ou mesmo uma lesão traumática no endotélio vascular. A interação dos neutrófilos com o endotélio vascular ativa a mieloperoxidase, uma glicoproteína que produz oxidantes potentes como o ácido hipocloroso, que por sua vez leva à lesão endotelial (AL-QUDAH, Z. et al 2011). A P-selectina tem um papel importante na promoção da aderência de plaquetas e leucócitos às células endoteliais após uma lesão isquêmica / reperfusão cerebral. Em um estudo com animais, camundongos deficientes em P-selectina tiveram menor interação de plaquetas e leucócitos com células endoteliais vasculares após lesão isquêmica / reperfusão cerebral. O cilostazol inibiu a interação de plaquetas e leucócitos, juntamente com as células endoteliais vasculares, um papel mediado pela P-selectina (GOTO, S. 2006).

### 3.5 EFEITO ANTIPROLIFERATIVO

In vitro, o cilostazol inibe a resposta proliferativa de células musculares lisas de ratos e humanos a uma variedade de fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), insulina, fator 1 semelhante à insulina e soro, indicando que esse efeito antiproliferativo é inespecífico para fatores de crescimento (AL-QUDAH, Z. A. et al 2011). Aumentos no AMPc causados pelo cilostazol podem inibir o crescimento celular via inibição da proteína quinase ativada por mitógeno e ciclinas relacionadas ao ciclo celular e suas quinases associadas (RYBALKIN S.D.; BORNFELDT K.E. 1999). A inibição da expressão do fator de crescimento em células musculares lisas (STITT, A. W. et al 1997) e o efeito antiagregante plaquetário, resultando na redução da liberação de PDGF, também podem contribuir para o efeito antiproliferativo do cilostazol. Por outro lado, o cilostazol aumentou os fatores de crescimento específicos de células endoteliais e estimulou o crescimento de células endoteliais (MORISHITA, R. et al 1997). O cilostazol também inibiu a indução da proteína 1 quimioatrativa de monócitos endoteliais vasculares, que se acredita ser um evento inicial no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (NISHIO, Y. et al 1997).

#### 3.5.4 Atividade Neuroprotetora

Estudos em animais mostraram que o cilostazol tem um efeito neuroprotetor nos cérebros de ratos. O cilostazol é neuroprotetor através de vários mecanismos: aumenta os níveis de Bcl-2, que é um promotor antioxidante antiapoptótico. Além disso, reduz os níveis de bax - uma proteína apoptótica, citocromo C e TNF-alfa que medeiam o efeito inflamatório e trombótico na isquemia cerebral. Que eventualmente provocam a morte através da indução da formação de radicais livres nas células da glia. Também ativa os canais de potássio nas células do neuroblastoma humano, levando à fosforilação de algumas proteínas e à diminuição da fosforilação de outras. Essas atividades resultam em alterações funcionais e proteção neuronal, impedindo a entrada de cálcio nos neurônios, diminuindo a formação de TNF-a e protegendo contra os efeitos nocivos do glutamato. O efeito protetor neuronal do cilostazol foi encontrado para prevenir o rompimento da barreira hematoencefálica e diminuir o edema cerebral (LEE, S. et al 2010).

### 3.5.5 Promover A Eliminação De Radicais Livres

O cilostazol aumenta o nível de metalotioneína, uma proteína responsável pela desintoxicação das cadeias pesadas, mantendo a homeostase do cobre e do zinco, mas também funciona como um antioxidante através da eliminação dos radicais livres produzidos pelo evento isquêmico. Em estudos com animais, o cilostazol aumentou a concentração de metalotioneína no fígado e no cérebro. No entanto, não aumentou significativamente a concentração em células humanas cultivadas (CULTURES, C. 2007).

### 3.5.6 Mobilização De Reserva De Gorduras

Os inibidores promovem lise dos adipócitos, mobilizando assim a gordura armazenada. Além disso, eles aumentam a taxa metabólica. Eles têm uma combinação de propriedades metabólicas que sugerem que poderiam ser úteis no tratamento da obesidade. Eles ainda possuem efeito na homeostase da glicose que indica que poderia ser útil como inibidor na obesidade diabética (SNYDER, P. B. 2005).

## 3.6 MODELO DE RATO DIABÉTICO

A estreptozotocina (STZ) foi inicialmente isolada de *Streptomyces achromogenes* em 1960, com suas propriedades diabetogênicas descritas depois de RAKIETEN, N. 1963. Essa ação é caracterizada por efeitos bioquímicos advindos da morte seletiva de células pancreáticas ilhotas (JUNOD, A. 1967; JUNOD, A. 1969). Como resultado dessa ação, os animais têm produção deficiente de insulina, hiperglicemia, polidipsia e poliúria, características da diabetes mellitus tipo 1 humana (KOLB, H. 1987; FURMAN, B. L. 2015).

O diabetes pode danificar neurônios (BARBER, A. J et al 1998), as células da glia (BARBER, A. J et al 2018) e os tecidos vasculares dentro da retina (DO CARMO, A. et al 1998). A evidência de alterações neuronais inclui a presença de apoptose (MARTIN, P. M. et al 2004) nas camadas retinianas internas e fotorreceptores em animais diabéticos (GASTINGER, M. J et al 2006). Essa perda de células relacionada ao diabetes a leva a uma redução na espessura da retina, o que foi demonstrado com histopatologia (GASTINGER, M. J et al 2006). As alterações histológicas da retina interna parecem ser mais graves (MARTIN, P. M. et al 2004).

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 PREPARO DOS ANIMAIS

O número da amostra foi calculado com base nos dados do artigo de XIE, et al. 2016. Sendo adotado um nível de significância de  $\alpha=0,05$ , para 4 grupos. Os cálculos foram realizados com base na média e desvio padrão, estabelecendo um poder de teste em 80%, usando o programa GPower 3.1.9.2. Com o N de 15 animais por grupo, observa-se que a força alcançada será acima de 95%, com isso caso ocorram perdas, essas não interferiram na qualidade da análise estatística.

Foram utilizados 60 ratos de 90 dias de vida, machos, e peso médio de aproximadamente 332g, oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Todos os animais foram mantidos em gaiolas, sendo em número máximo de 5 animais por gaiola, com água “ad libitum”, em ambiente com temperatura e umidade controlada.

### 4.2 MODELO DE RATO HIPERGLICÊMICO

Os ratos foram mantidos em jejum apenas de comida e não de água por 4 horas. Foram pesados e a glicemia capilar na calda do animal foi aferida. Então foi administrado 40 mg/kg de estreptozotocina (40g/l) diluída em soro fisiológico através de injeção peritoneal. No segundo dia a glicemia desses animais foi aferida novamente. Os animais que apresentaram glicemia abaixo de 150 mg/dl receberam nova injeção de 40 mg/kg de estreptozotocina e aqueles que apresentaram glicemia entre 150 e 250 mg/dl receberam nova injeção de estreptozotocina de 20mg/kg. Naqueles ratos que apresentaram glicemia acima de 250 mg/dl não foi realizado nova administração de estreptozotocina. No sétimo dia do experimento foi realizado nova aferição da glicemia capilar da calda do animal para comprovar o estabelecimento do modelo de rato diabético (glicemia capilar acima de 200mg/dl).

Os animais que não desenvolverem diabetes mellitus foram descartados do experimento. A glicemia capilar desses animais foi aferida duas vezes por semana. E quando apresentaram glicemia acima de 350 mg/dl receberam Insulina Glargina na dose de 3 U subcutânea.

#### 4.3 ADMINISTRAÇÃO DE CILOSTAZOL

Foram randomizados e divididos em 2 grupos. O grupo de diabetes mellitus de controle (15 ratos) foi administrado apenas o veículo por gavagem por 8 semanas. No grupo de tratamento (15 ratos) foi administrado cilostazol oral por gavagem na dose de 30mg/kg conforme Jung et al mostrou efeito neuroprotetor das células ganglionares durante o período de 8 semanas, tempo de diabetes necessário para leucocitose, alterações vasculares e no número de células da retina (ativação glial, redução de fotorreceptores e apoptose de células ganglionares) no modelo de rato diabético induzido por estreptozotocina (KA, A. et al 2013).

Tabela 1 – Grupos do experimento:

Grupos	Medicamentos
Não diabético não tratado	Veículo oral
Diabético não tratado	Estreptozotocina intraperitoneal + Veículo oral
Não diabéticos tratado	Cilostazol oral
Diabético tratado	Estreptozotocina intraperitoneal + Cilostazol oral

#### 4.4 REMOÇÃO DOS TECIDOS

Depois do período de tratamento com Cilostazol, todos os ratos foram submetidos a eutanásia com superdosagem de anestesia geral (xilazina e quetamina intraperitoneal). Feito uma incisão torácica para acesso ao coração e coletado de sangue intra ventricular. Então, os olhos foram enucleados. Um dos olhos macerado e o outro fixado em parafina.

#### 4.5 ANÁLISE DAS CITOCINAS OCULARES

Após remoção, um dos globos oculares foi pesado e colocado em eppendorf identificado com solução PBS 100ml. Em seguida congelado a -80°C.

Esses olhos foram macerados em macerador de tecidos e diluídos em “300ml de solução PBS”.

Kits Elisa balanceados (Kit Elisa de VEGF para ratos; Kit Elisa para IL-1b; Kit de Elisa para ratos de Anti-VEGF; Kit Elisa de IL-6 para ratos; Kit Elisa de TNF-a para ratos)



foram usados para determinar os níveis de citocinas nos olhos macerados. E os dados foram analisados por meio do software de dados do Elisa.

#### 4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA RETINA

Após remoção, os olhos foram divididos ao meio no meridiano horizontal, incluindo o nervo óptico, e então fixados em parafina. Para análise histológica os blocos foram cortados ao longo do meridiano horizontal com cortes perpendiculares a retina. Usamos coloração por hematoxilina e eosina. Cortes oblíquos, artefatos da técnica, que deixaram a retina mais espessa foram descartados.

##### **Espessura das camadas da retina.**

A análise morfométrica da retina foi realizada conforme descrito previamente (HUGHES, W. F. 1991). A espessura de quatro diferentes camadas retinianas foi medida: a espessura da membrana limitante interna para a membrana limitante externa (ILM-OLM), a camada plexiforme interna (IPL), a camada nuclear interna (INL) e a camada nuclear externa (ONL).

##### **Contagem de células da retina.**

Para quantificar o grau de perda de células da retina, contamos o número de núcleos de células por 50  $\mu\text{m}$  de comprimento em seções retinianas como densidades celulares lineares. O número de núcleos de células de três camadas retinianas (GCL, INL e ONL) foi contado na largura de 50  $\mu\text{m}$  na retina de ambas as seções hemisféricas a uma distância de 1,5 mm da cabeça do nervo óptico.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados com estimativa de média, mediana, desvio padrão, mínimo e máximo de todas as variáveis individualmente e por grupo. Em seguida, verificou-se a aderência das mesmas quanto à distribuição normal pelo teste Shapiro-Wilk. Para as variáveis com distribuição normal, a diferença entre os grupos foi

avaliada com a ANOVA, seguida de Tukey como post-hoc (abordagem paramétrica). Para as variáveis sem distribuição normal, as diferenças entre os grupos foram avaliadas com a prova de Kruskal-Wallis seguida de Dunn como post-hoc (abordagem não paramétrica). Para melhor visualização dos resultados, produziu-se gráficos do tipo boxplot (não paramétricas) e barra de erro com IC 95% (paramétricas) diferenciando-se entre os grupos avaliados. Os testes foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  e as análises foram realizadas no SPSS 21.0 (IBM, 2012).

## **5 RESULTADOS**

### **Exclusões e perdas**

Foram separados aleatoriamente 30 ratos para injeção de estreptozotocina 40 mg/kg. No segundo dia do experimento 13 ratos apresentavam glicemia acima de 250 mg/dl, 9 ratos apresentaram glicemia entre 150 e 250 mm/dl e foram destinados para uma segunda dose de 20 mg/kg estreptozotocina inicial e, ainda, 8 ratos apresentaram glicemia inferior a 150 mg/dl e foram submetidos a uma segunda dose de 40mg/kg de estreptozotocina intraperitoneal. Após nova glicemia capilar no sétimo dia 6 ratos foram excluídos da pesquisa porque apresentavam glicemia inferior a 200 mg/dl.

Durante o período de tratamento, 1 rato do grupo de ratos não diabéticos tratados com cilostazol e um rato do grupo de ratos diabéticos tratados com veículo morreram. No final do experimento, o grupo de rato não diabético tratado com veículo era composto por 15 ratos, o grupo de rato não diabético tratado com cilostazol era composto por 14 ratos, o grupo de rato diabético tratados com veículos era composto por 12 ratos e o grupo de ratos diabéticos tratados com cilostazol era composto por 11 ratos.

### **Citocinas Oculares**

Kits Elisa balanceados usados no estudo (Kit Elisa de VEGF para ratos; Kit Elisa para IL-1b; Kit de Elisa para ratos de Anti-VEGF; Kit Elisa de IL-6 para ratos; Kit Elisa de TNF-a para ratos) não tiveram sensibilidade necessária para identificar essas citocinas oculares em todos os grupos.

### **Aferição das espessuras e contagem de núcleos**

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas variáveis contagem de núcleos da camada nuclear externa, espessura da nuclear interna e espessura da nuclear externa ( $p > 0,05$ ).

Tabela 2 – Média e desvio padrão da análise morfométrica da retina dos grupos.

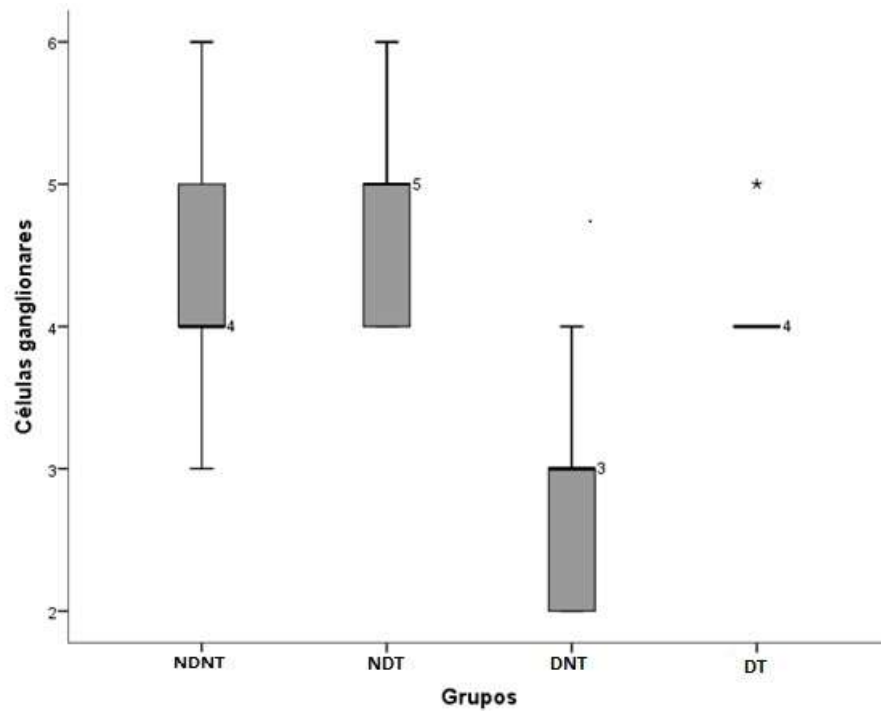
	NDNT		NDT		DNT		DT		p-valor
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	
Células ganglionares	4	1	5	1	3	1	4	0	<0,001
Nuclear Interna	35	3	44	7	35	5	36	6	0,001
Nuclear externa	122	16	131	24	111	14	116	13	0,100
E Total	0,179	0,028	0,190	0,021	0,174	0,013	0,165	0,015	0,021
E Plexiforme interna	0,069	0,010	0,078	0,008	0,071	0,006	0,069	0,003	0,006
E Nuclear Interna	0,029	0,004	0,032	0,005	0,030	0,003	0,027	0,006	0,154
E Nuclear externa	0,055	0,011	0,055	0,008	0,050	0,007	0,051	0,006	0,424

Notas: NDNT – não diabético não tratado; NDT – não diabético tratado; DNT – diabético não tratado; DT – diabético tratado.

### Células Ganglionares

O número de núcleos na camada de células ganglionares foi significativamente maior no grupo de ratos sem diabetes e sem tratamento com cilostazol em relação ao grupo de ratos com diabetes e sem tratamento ( $p < 0,05$ ). A contagem de núcleos no grupo de ratos diabéticos tratados foi significativamente maior do que o grupo de ratos diabéticos não tratados ( $p < 0,05$ ). A média de núcleos do grupo de ratos não diabéticos tratados foi significativamente maior do que o grupo de ratos diabéticos e tratados ( $p < 0,05$ ). Ainda, não foi identificada diferença estatisticamente significativa na média de núcleos entre os grupos não diabético e não tratado e o grupo não diabético e tratado com cilostazol ( $p > 0,05$ ). Assim como, não foi identificado uma diferença estatisticamente significativa entre as médias de núcleos entre os grupos de não diabéticos e não tratados e o grupo de ratos diabéticos e tratados com cilostazol ( $p > 0,05$ ).

Gráfico 1 – Distribuição da contagem de células ganglionares entre os grupos.



Notas: NDNT – não diabético não tratado; NDT – não diabético tratado; DNT – diabético não tratado; DT – diabético tratado.

### Nuclear Interna

O grupo de ratos não diabéticos tratados com cilostazol teve uma média de núcleos na camada nuclear interna significativamente maior do que os grupos de ratos: diabéticos não tratados, diabéticos tratados e não diabéticos não tratados ( $p < 0,05$ ). Mas não foi encontrado diferença estatisticamente significativa entre o grupo de ratos não diabéticos não tratados e o grupo de ratos diabéticos não tratados ( $p > 0,05$ ). Assim como, não foi identificado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo de ratos diabéticos tratados e diabéticos não tratados ( $p > 0,05$ ).

### Espessura total da retina

A média da espessura total da retina no grupo de ratos não diabéticos tratados foi significativamente superior ao grupo de ratos diabéticos e diabéticos tratados ( $p < 0,05$ ). Mas não houve diferença estatisticamente significativa na média da espessura total da retina do grupo de ratos não diabéticos e tratados em relação ao grupo de ratos não diabéticos e não

tratados ( $p>0,05$ ). Assim como, não houve diferença na média da espessura total da retina entre o grupo de ratos diabéticos tratados em relação ao grupo de diabéticos não tratados ( $p>0,05$ ).

### Espessura da camada plexiforme interna

A espessura da camada plexiforme interna do grupo de ratos não diabéticos tratados com cilostazol foi significativamente maior do que o grupo de ratos diabéticos tratados e grupo de ratos não diabéticos e não tratados ( $p<0,05$ ). Mas não houve diferença estatisticamente significativa na média da espessura da camada plexiforme interna da retina do grupo de ratos não diabéticos e não tratados em relação ao grupo de ratos diabéticos e não tratados ( $p>0,05$ ). Assim como, não houve diferença estatisticamente significativa na média da espessura da camada plexiforme interna da retina entre o grupo de ratos diabéticos tratados em relação ao grupo de diabéticos não tratados ( $p>0,05$ ).

Tabela 3 – Comparação estatística da análise morfométrica entre os grupos.

p-valor	NDNT	NDNT	NDNT	NDT	NDT	DNT
	X	X	X	X	X	X
	NDT	DNT	DT	DNT	DT	DT
Células ganglionares	0,270	<0,001	0,281	<0,001	0,033	<0,001
Nuclear Interna	<0,001	0,867	0,610	0,001	0,008	0,566
E Total	0,112	0,943	0,237	0,036	0,002	0,151
E Plexiforme interna	0,009	0,847	1,000	0,104	0,020	0,887

Notas: NDNT – não diabético não tratado; NDT – não diabético tratado; DNT – diabético não tratado; DT – diabético tratado.

## 6 DISCUSSÃO

O fato dos kits Elisa das citocinas inflamatórias não terem sensibilidade para identificar as citocinas inflamatórias no olho do rato diabético sugere que no período de oito semanas não foi suficiente para desenvolver um componente inflamatório importante da retinopatia diabética.

A análise morfométrica da retina desse experimento não evidenciou diferença estatisticamente significativa nas espessuras da retina no modelo de rato com diabetes induzida por injeção intra peritoneal de estreptozotocina após 8 semanas em relação ao grupo de rato não diabético e não tratados, seguindo os resultados descritos por Lai AK; Lo AC 2013. Entretanto, a diferença estatisticamente superior do grupo de rato não diabético tratado na espessura total da retina e na espessura da camada plexiforme interna em relação aos grupos de ratos diabéticos tratados e não tratados sugerem um efeito neuroprotetor do cilostazol na retina.

Evidenciou-se uma perda significativa nas células ganglionares no grupo de ratos com 8 semanas de indução de diabetes mellitus com estreptozotocina conforme já demonstrado por KA, A. et al 2013 em estudos anteriores com esse modelo de rato diabético.

Nessa presente pesquisa o grupo de ratos diabéticos tratados com Cilostazol apresentou uma perda de células ganglionares inferior ao grupo de rato diabético não tratado. E ainda, os grupos de ratos não diabéticos não tratados e o grupo de ratos diabéticos tratados se apresentaram estatisticamente semelhantes. Sugerindo que esse medicamento tem um potencial protetor das células ganglionares e sendo uma opção terapêutico na retinopatia diabética, confirmando a hipótese de Jung, K. I. et al 2013.

O experimento também não mostrou diferença significativa na média de núcleo de células na camada nuclear interna e na camada nuclear externa entre os grupos de ratos diabético e não diabético. Supostamente, o experimento deveria ter um tempo superior a 8 semanas para evidenciar diferença estatisticamente significativa de perda de núcleos celulares na retinopatia diabética em ratos nessas camadas da retina.

Também foi identificado que o grupo de ratos não diabéticos tratados com Cilostazol apresentou maior número de núcleos na camada nuclear interna em relação aos outros do experimento. Essas evidências sugerem que o Cilostazol tem um efeito neuroprotetor em outras as camadas da retina além da camada de células ganglionares.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Esse experimento deixa algumas dúvidas que poderão ser respondidas com experimentos com maior tempo de indução de diabetes mellitus por estreptozotocina e maior tempo de tratamento com cilostazol. Ainda, sugere que o Cilostazol pode ter efeito neuroprotetor em outras doenças neuroretinianas, como o Glaucoma, que também se apresenta pela perda de células ganglionares (WEINREB, R.N. 2014).



## REFERÊNCIAS

- AGUZZI A.; Barres B.A; B. M. (2015). Microglia: scapegoat, saboteur, or something else?, 339(6116), 156–161.
- AL-QUDAH, Z. A., Hassan, A. E., Qureshi, A. I. (2011). Cilostazol in patients with ischemic stroke, 1305–1315.
- BARBER, A. J., Antonetti, D. A., Gardner, T. W. (2018). Altered Expression of Retinal Occludin and Glial Fibrillary Acidic Protein in Experimental Diabetes.
- BARBER, A. J., Lieth, E., Khin, S. A., Antonetti, D. A., Buchanan, A. G., Gardner, T. W. (1998). Neural Apoptosis in the Retina during Experimental and Human Diabetes Early Onset and Effect of Insulin. *Clin Invest.* 1998;102:783–791, 783–791.
- BURSELL, S., Clermont, A., Kinsley, B., Simonson, D., Aiello, L., Wolpert, H. (1996). Retinal blood flow changes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 37(5), 886–897.
- CARRASCO, E., Francisco, G. (2005). IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy, 719–722.
- CHUANG, J. L. T., Lee, J. C. C. (2015). Cilostazol attenuates the severity of peripheral arterial occlusive disease in patients with type 2 diabetes: the role of plasma soluble receptor for advanced glycation end-products.
- CONGDON, N., Zheng, Y., He, M. (2012). The worldwide epidemic of diabetic retinopathy. *Indian Journal of Ophthalmology*, 60(5), 428.
- CULTURES, C. (2007). Induction of Metallothionein Synthesis by Cilostazol in Mice and in, 30(April), 791–794.
- DIRETRIZES SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2017-2018.
- DO CARMO, A., Ramos P., Reis A., Proenca R., C. J. (1998). Breakdown of the Inner and Outer Blood Retinal Barrier in Streptozotocin-Induced Diabetes. *Exp Eye Res.* 1998;67:569–575, 569–575.
- EGASHIRA, S. K. and K. (2002). Gene Therapy Targeting Monocyte Chemoattractant Protein-1 for Vascular Disease.
- EL RAMI, H., Barham, R., Sun, J. K., Silva, P. S. (2017). Evidence-Based Treatment of Diabetic Retinopathy. *Seminars in Ophthalmology*, 32(1), 67–74.
- FERN, L., Maneu, V., De, P., Lax, P., Pinilla, I. (2014). Progress in Retinal and Eye Research Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases Nicol a, 43.
- FU, S., Dong, S., Zhu, M., Sherry, D. M., Wang, C. (2015). Müller Glia Are a Major Cellular Source of Survival Signals for Retinal Neurons in Diabetes, 64(May), 3554–3563.
- FURMAN, B. L. (2015). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology / Editorial Board, S.J. Enna (Editor-in-Chief) ... [et Al.]*, 70(September), 5.47.1-5.47.20.

- GALYFOS, G., Sianou, A. (2017). Cilostazol for Secondary Prevention of Stroke : Should the Guidelines Perhaps Be Extended ?, 33(3), 89–92.
- GASTINGER, M. J., Singh, R. S. J., Barber, A. J. (2006). Loss of Cholinergic and Dopaminergic Amacrine Cells in Streptozotocin-Diabetic Rat and Ins2 Akita -Diabetic Mouse Retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47:3143–3150., 47(7).
- GONG, Y., Ren, Z. C. R. (2012). Protective Effects of Adeno-associated Virus Mediated Brain-derived Neurotrophic Factor Expression on Retinal Ganglion Cells in Diabetic Rats, 467–475.
- GOTO, S. (2006). Cilostazol: Potential mechanism of action for antithrombotic effects accompanied by a low rate of bleeding, 6, 3–11.
- GROOP, L., Ahlqvist. E, Storm, P., Käräjämäki A., Martinell, M., Dorkhan, M., Carlsson, A., et al (2018). Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 361–369.
- GUSTAVSSON, C., Agardh, C., Agardh, E. (2012). Profile of intraocular tumour necrosis factor-  $\alpha$  and interleukin-6 in diabetic subjects with different degrees of diabetic retinopathy, (Brownlee 2001), 1–8.
- HOTAMISLIGIL, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders, 444 (December).
- HUANG, H., Gandhi, J. K., Zhong, X., Wei, Y., Gong, J., Duh, E. J., Vinoros, S. A. (2010). TNF Is Required for Late BRB Breakdown in Diabetic Retinopathy, and Its Inhibition Prevents Leukostasis and Protects Vessels and Neurons from Apoptosis, 1336–1344.
- HUGHES WR. Quantitation of ischemic damage in the rat retina. *Exp Eye Res.* 1991;53:573-582.
- IBM CORP. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- IDO, Y., Kawamura, T., Nyengaard, J. R., Enden, M. V. A. N. D. E. N., Kilo, C., Tilton, R. G. (1993). Perspectives in Diabetes Hyperglycemic Pseudohypoxia and Diabetic Complications, 42(June), 801–813.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Atlas. 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2015.
- IYAMOTO, K. A. M., Hosrof, S. A. K., Ursell, S. V. E. N. R. I. K. B., Ohan, R. I. R., Urata, T. O. M. (1999). Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition, 96(September), 10836–10841.
- JUNG, K. I., Kim, J. H., Park, H.-Y. L., And Park, C. K. (2013). Neuroprotective Effects of Cilostazol on Retinal Ganglion Cell Damage in Diabetic Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 345(3), 457–463.
- JUNOD, A., Lambert, A.E., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A.E., and Renold, A.E. 1967. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126:201-205.
- JUNOD, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W., and Renold, A.E. 1969. Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.* 48:21292139.
- KIMURA Y., Tani T., Kanbe T., Watanabe K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittelforschung* 1985;35:1144–1149.

- KLEIN, C. J. L., Olsson, L., Nielsen, J. (2018). Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae* : the role of M/G7 in metabolic functions, (1 998), 13–24.
- KOLB, H. 1987. Mouse models of insulin dependent diabetes: Low-dose streptozocin-induced diabetes and nobese diabetic(NOD) mice. *Diabetes Metab. Rev.* 3:751-778.
- KOYA, D., King, G. L. (1998). *Perspectives in Diabetes*, 859–866.
- KUR, J., Newman, E. A., Chan-ling, T. (2012). Progress in Retinal and Eye Research Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 31(5), 377–406.
- KURIHARA, T., Westenskow, P. D., Bravo, S., Aguilar, E., Friedlander, M. (2012). Brief report Targeted deletion of *Vegfa* in adult mice induces vision loss, 122(11), 4213–4217.
- KVANTA, A., Kvanta, A. (2015). Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in choroidal fibroblasts Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in choroidal fibroblasts, 3683(November).
- Lai AK, Lo AC. Animal models of diabetic retinopathy: summary and comparison. *J Diabetes Res.* 2013; 2013:106594.
- LEASHER, J. L., Bourne, R. R. A., Flaxman, S. R., Jonas, J. B., Keeffe, J., Naidoo, K., ... Taylor, H. R. (2016). Global estimates on the number of people blind or visually impaired by diabetic retinopathy: A meta-analysis from 1990 to 2010. *Diabetes Care*, 39(9), 1643–1649.
- LEE, S., Suh, J., Park, K. W., Lee, H., Kang, H., Koo, B., Kwon, T. (2010). Study design and rationale of ‘Influence of Cilostazol-based triple anti-platelet therapy on ischemic complication after drug-eluting stent implantation (CILON-T)’ study: A multicenter randomized trial evaluating the efficacy of Cilostazol on ischemic vascular complications after drug-eluting stent implantation for coronary heart disease, 1–8.
- LIU, Y., Shakur, Y., Yoshitake, M., Kambayashi, J. (2001). A Dual Inhibitor of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Type 3 and Adenosine Uptake, 19(4), 369–386.
- MARTIN, P. M., Roon, P., Ells, T. K. Van, Ganapathy, V., Smith, S. B. (2004). Death of Retinal Neurons in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:3330–3336, 45(9), 3330–3336.
- MCLEOD, D. S., Lefer, D. J., Merges, C., Luty, G. A. (1995). Enhanced Expression of Intracellular Adhesion Molecule-1 and P-Selectin in the Diabetic Human Retina and Choroid, 147(3), 642–653.
- MENDANHA, D., Abrahão, M., Vilar, M., Nassaralla Jr, J. (2016). Risk factors and incidence of diabetic retinopathy. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, 75(6), 443–446.
- MILLER, J. W. (1997). Vascular endothelial growth factor and ocular neovascularization. *The American Journal of Pathology*, 151(1), 13–23.
- MILLER, J. W., Couter, J. Le, Strauss, E. C., Ferrara, N. (2013). Vascular Endothelial Growth Factor A in Intraocular Vascular Disease. *OPHTHA*, 120(1), 106–114.
- MINA, A., Favalaro, E. J., Koutts, J. (2007). Hemostatic dysfunction associated with endocrine disorders as a major risk factor and cause of human morbidity and mortality: A comprehensive meta-review. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 33(8), 798–809.

- MIZUTANI, M., Kern, T. S., Lorenzi, M. (1996). Rapid Publication Accelerated Death of Retinal Microvascular Cells in Human and Experimental Diabetic Retinopathy, 97(12), 2883–2890.
- MORAN, E. P., Wang, Z., Chen, J., Sapienza, P., Smith, L. E. H., Ma, J. (2016). Neurovascular cross talk in diabetic retinopathy: Pathophysiological roles and therapeutic implications. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 311(3), H738–H749.
- NAKAMURA, T., Uchiyama, S., Yamazaki, M., Iwata, M. (2007). Synergistic effect of cilostazol and dipyridamole mediated by adenosine on shear-induced platelet aggregation.
- NATARAJAN, A., Zaman, A. G., Marshall, S. M. (2008). Platelet hyperactivity in type 2 diabetes: role of antiplatelet agents. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 5(2), 138–144.
- NISHIO Y., Kashiwagi A, Takahara N, Hidaka H, Kikkawa R. Cilostazol, a cAMP phosphodiesterase inhibitor, attenuates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in response to tumor necrosis factor-alpha in vascular endothelial cells. *Horm Metab Res* 1997;29:491–495.
- ODEGAARD, J. I., Chawla, A. (2013). Pleiotropic Actions of Insulin, 172.
- OMI, H., Okayama, N., Shimizu, M., Fukutomi, T., Nakamura, A., Imaeda, K., ... Itoh, M. (2004). Cilostazol inhibits high glucose-mediated endothelial-neutrophil adhesion by decreasing adhesion molecule expression via NO production, 68, 119–125.
- PAULUS, Y. M., Sodhi, A., Arbor, A. (2018). Anti-angiogenic Therapy for Retinal Disease. *HHS Public Access*, 271–307.
- RAFEHI, H., El-Osta, A., Karagiannis, T. C. (2011). Genetic and epigenetic events in diabetic wound healing. *International Wound Journal*, 8(1), 12–21.
- RAKIETEN, N., Rakieten, M.L., and Nadkarni, M.V. 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother. Rep.* 29:91.
- RYBALKIN S.D., Bornfeldt KE. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and human arterial smooth muscle cell proliferation. *Thromb Haemost* 1999;82:424–434.
- SCARINCI, F., Nesper, P. L., Fawzi, A. A. (2016). Deep Retinal Capillary Nonperfusion Is Associated with Photoreceptor Disruption in Diabetic Macular Ischemia. *American Journal of Ophthalmology*, 168, 129–138.
- SCHÄFER, A., Bauersachs, J. (2008). Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. *Current Vascular Pharmacology*, 6(1), 52–60.
- SCIENCES, M., SCIENCES, M. (1998). Aldose Reductase : a Window to the Treatment of Diabetic Complications ?, 17(3).
- SNYDER, P. B. (2005). The adipocyte cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3B) as a target for lipolytic and thermogenic agents for the treatment of obesity. *Emerging Therapeutic Targets*, 3:4, 587-599.
- SONE, H., Kawakami, Y., Okuda, Y., Sekine, Y., Honmura, S., Matsuo, K., Yamashita, K. (1997). Ocular vascular endothelial growth factor levels in diabetic rats are elevated before observable retinal proliferative changes, 726–730.

SORRENTINO, F. S., Allkabes, M., Salsini, G., Bonifazzi, C., Perri, P. (2016). The importance of glial cells in the homeostasis of the retinal microenvironment and their pivotal role in the course of diabetic retinopathy. *Life Sciences*, 162, 54–59.

STEM M.S., Gardner T.W. (2013) Neurodegeneration in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Current medicinal chemistry*. 2013;20(26):3241-3250.

STITT, A. W., Li, Y. M., Gardiner, T. A., Bucala, R., Archer, D. B., Vlassara, H. (1997). Advanced Glycation End Products (AGEs) Co- Localize with AGE Receptors in the Retinal Vasculature of Diabetic and of AGE-Infused Rats, 150(2), 523–531.

TANAKA T., Ishikawa T., Hagiwara M., Onoda K., Itoh H., Hidaka H. Effects of cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor on the contraction of vascular smooth muscle. *Pharmacology* 1988;36:313–320.

UMEGAKI H. Neurodegeneration in diabetes mellitus. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 724:258–265.

WEINREB R.N., Aung T., Medeiros F.A. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *Jama*. 2014; 311(18): 190.

WHO 2016. Global report on diabetes.

WITMER, A. N., Vrensen, G. F. J. M., Noorden, C. J. F. Van, Schlingemann, R. O. (2003). Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease, 22, 1–29.

XIE, T. Y., Yan, W., Lou, J., Chen, X. Y. (2016). Effect of ozone on vascular endothelial growth factor (VEGF) and related inflammatory cytokines in rats with diabetic retinopathy. *Genetics and Molecular Research*, 15(2), 1–11.

YASUDA K., Sakuma M., Tanabe T. Hemodynamic effect of cilostazol on increasing peripheral blood flow in arteriosclerosis obliterans. *Arzneimittelforschung* 1985;35:1198–1200.

ZENG H.Y., Green WR, T. M. (2015). Microglial Activation in Human Diabetic Retinopathy, 126(2), 227–232.

ZHOU, J., Wang, S., Xia, X. (2012). Role of Intravitreal Inflammatory Cytokines and Angiogenic Factors in Proliferative Diabetic Retinopathy, 37(1), 416–420.