

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE CAMU-CAMU  
(*MYRCIARIA DUBIA*) NA DIETA DE PACUS (*PIARACTUS  
MESOPOTAMICUS*) ALOXANO-DIABÉTICOS SOBRE A  
RETINA**

**Karina Eliana Herencia Bueno  
Médica Veterinária**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE CAMU-CAMU  
(*MYRCIARIA DUBIA*) NA DIETA DE PACUS (*PIARACTUS  
MESOPOTAMICUS*) ALOXANO-DIABÉTICOS SOBRE A  
RETINA**

**Karina Eliana Herencia Bueno**

**Orientador: Prof. Dr. Fabricio Singaretti de Oliveira**

**Coorientadores: Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes**

**Prof. Dr. José Luiz Laus**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal-SP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Cirurgia Veterinária.

**2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA

B928e Bueno, Karina Eliana Herencia  
Efeito da suplementação de camu-camu (*Myrciaria dubia*) na dieta de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) aloxano-diabéticos sobre a retina / Karina Eliana Herencia Bueno. -- Jaboticabal, 2021  
108 f. : tabs., fotos  
  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
Orientador: Fabricio Singaretti de Oliveira  
Coorientadora: Julieta Rodini Engrácia de Moraes  
  
1. Antioxidantes. 2. Diabetes. 3. Retina. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*) NA DIETA DE PACUS (*Piaractus Mesopotamicus*) ALOXANO-DIABÉTICOS SOBRE A RETINA

**AUTORA: KARINA ELIANA HERENCIA BUENO**

**ORIENTADOR: FABRICIO SINGARETTI DE OLIVEIRA**

**COORDENADOR: JOSÉ LUIZ LAUS**

**COORDENADORA: JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FABRICIO SINGARETTI DE OLIVEIRA (Participação Virtual)  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV - UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. ALEXANDRE PINTO RIBEIRO (Participação Virtual) P/  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária-FAVET/UFMT / Cuiabá/MT

Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES (Participação Virtual) P/  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNESP / FCAV - Jaboticabal

Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI (Participação Virtual) P/  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Dra. CAMILA BALTAZAR (Participação Virtual) P/  
Pupila Oftalmologia Veterinária - Pupilavet / Salvador/BA

Jaboticabal, 09 de abril de 2021

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

KARINA ELIANA HERENCIA BUENO - nascida em 12 de abril de 1984, no distrito de Jesus María, Lima, Peru, e filha de Consuelo Bueno de Herencia e Fernando Miguel Herencia Elliot. Cursou Medicina Veterinária entre 2003 e 2010, na Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Realizou, em 2014, o curso de Oftalmologia de Animais de Companhia na mesma Universidade onde se graduou. Em 2015 ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal-SP, com bolsa do Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq). Tornou-se mestra em 2017 em Cirurgia Veterinária sob a orientação do prof. José Luiz Laus. Atualmente, é aluna regular do curso de Doutorado e atuante do Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital Universitário da FCAV - UNESP - Câmpus de Jaboticabal-SP, sob orientação do Prof. Dr. Fabrício Singaretti de Oliveira e coorientação do prof. Dr. José Luiz Laus e da profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes. Possui experiência em cirurgia geral e oftalmologia de cães e gatos.

## DEDICATÓRIA

**A**os meus pais Consuelo Bueno de Herencia  
e Fernando Miguel Herencia Elliot,

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu senhor Jesus, por todos os privilégios, graças e experiências durante esses anos no Brasil. A minha mãe Maria, Nossa Senhora Aparecida, pela companhia, sua interseção e as graças concedidas.

A minha mãe Consuelo Bueno e meu pai Miguel Herencia pela vida que me deram e nessa etapa ainda de longe estão presentes.

A minha tia Elena Bueno, pelo carinho e preocupação durante todo esse tempo.

A irmã Elizabeth Herencia, pelo apoio e companhia nesse tempo todo.

A minha prima Marisol Bueno, quem tem sido uma grande inspiração e muitas vezes o maior grande apoio em tantas situações. Ter tido ela nesse tempo, a sua compreensão e o carinho que sempre me deu, assim como seus conselhos, facilitaram esta etapa da minha vida.

A minha prima Patricia Bueno porque sempre foi um apoio e companhia.

Ao Rafael Romaneli, por ter sido um grande amigo, vizinho, colega e parceiro, agradeço todos seus ensinamentos durante a pesquisa.

Ao Kifajat Ulah Khan, pela parceria, cuidados, apoio e seus ensinamentos durante a pesquisa.

A Nicoli Mello, por me ajudar quando precisei, pois nossa amizade é incondicional. pela enorme ajuda que sempre tive a toda hora em qualquer dia, a paciência e sobretudo por sempre me transmitir o amor de Deus.

Ao Gabriel Carra, uma pessoa incrível por dentro e fora do trabalho. Não tenho palavras que resumam tudo o que você fez por mim, desde cada abraço que me deu, seus sorrisos que mudavam os ânimos. Obrigada por ter me auxiliado o tempo todo, sem a sua parceria não teria logrado aos resultados obtidos durante a minha jornada no doutorado.

A Andreia Constantino, por ser tão maravilhosa, amiga, mãe, irmã. Sempre contagiando a todos com essa alegria e energia boa, que é impossível não amar.

A Ediana Ramos, minha amiga e vizinha que chegou para me motivar e assegurar meus dias em Jaboticabal. Com esse coração gigante, trazendo alegria e paz que irradia, sem dúvida você fez diferença em mim.

Ao Marco Palacios, pela amizade, brincadeiras, apoio e carinho em muitos momentos da minha estadia no Brasil.

Ao Manuel Neto, sou grata de ter o conhecido e ter tido essa convivência durante a pesquisa, pela qualidade de pessoa e profissional, pela amizade e sua ajuda incondicional.

Ao professor Fabrício Singaretti, pela orientação, paciência e o enorme apoio durante todo esse tempo.

Ao meu querido professor José Luiz Laus, pela coorientação e o carinho que sempre teve.

Ao professor Flavio Ruas, por todo seu apoio, ajuda incondicional, pelos conhecimentos oferecidos, sua paciência que me deixaram marcada para toda a minha vida.

A professora Julieta Engrácia, pela coorientação, ajuda na pesquisa, pelo seu apoio, confiança e carinho.

Ao professor João Kochenborger, pelo enorme apoio e toda a confiança que me deu para o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Alex Cueva, pela ajuda, paciência, ideias, ensinamentos e a sua orientação que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Dr. Ivan Padua, pela motivação, entusiasmo e amizade durante todo o tempo, a sua parceria, colaboração e experiência que foram importantes na pesquisa.

A Ms. Rachel Neto pelos ensinamentos e toda a sua colaboração na pesquisa.

A Dra. Mayara Rosolem pela amizade, paciência, parceria, ensinamentos e colaboração na pesquisa.

A Daniela Moura, que me apoiou nos momentos difíceis. Ter tido a sua ajuda e parceria aliviou muito o trabalhão que íamos ter na frente.

Ao Alexandre Sobrinho, pela qualidade de profissional, ajuda, ideias, compromisso e a parceria durante o experimento.

A Marcella Rosa, Bya e Francimery pelos conselhos, paciência e por serem muito parceiras.

Aos funcionários da UNESP, Antonio, Mabel, Silvinha, Chica, e Edson, sou grata da segurança que me deram em cada etapa do experimento.

Ao Sr. Valdecir pela ajuda e sua disposição para os cuidados dos meus pacientes.



Ao Paulo Henrique, Júlio, Gabriela, Leticia, Paulo, Isabela, pelos ensinamentos e parcerias que sempre me forneceram.

Ao Maicon, ao Jorge, a Jianine, Franciele pela amizade e companhia nesses dias em Jaboticabal.

Ao Fernando, Bruno, Livia, Thainara, Gabriela, Carlos, Kietlin, Felipe, Catarina, Ana, Caroline, Jayne, Alejandra, Wendy, Matheus e José pela ajuda que recebi sempre durante a pesquisa, pois vocês foram parte essencial durante meu aprendizado nessa instituição.

Aos meus peixes, que foram utilizados para os diversos testes desde o desenvolvimento do piloto até o experimento, muitos deles foram submetidos a eutanásia e outros que conseguiram ser liberados ao final deste. Não tem sido fácil trabalhar com vocês, e sou grata pela enorme experiência que me permitiram ter, agora que voltaram ao Céu, já estão em casa.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pela bolsa e financiamento da pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                              |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) .....                                                                                              | iii  |
| RESUMO .....                                                                                                                                                 | iv   |
| Palavras-chave.....                                                                                                                                          | iv   |
| ABSTRACT - .....                                                                                                                                             | v    |
| Keywords .....                                                                                                                                               | v    |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....                                                                                                                                   | vi   |
| LISTA DE FIGURAS .....                                                                                                                                       | vii  |
| LISTA DE TABELAS .....                                                                                                                                       | xiii |
| CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais.....                                                                                                                       | 1    |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                          | 1    |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....                                                                                                                                | 2    |
| 2.1. Diabetes mellitus (DM) .....                                                                                                                            | 2    |
| 2.2. Modelos para estudos sobre DM .....                                                                                                                     | 2    |
| 2.3. A retina .....                                                                                                                                          | 5    |
| 2.4. Neuroregeneração e estresse oxidativo no DM.....                                                                                                        | 6    |
| 2.5. Diabetes mellitus, retinopatia e neuroproteção.....                                                                                                     | 7    |
| 2.6. Camu-camu ( <i>Myrciaria dubia</i> ) e diabetes.....                                                                                                    | 8    |
| 3. REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                          | 10   |
| CAPÍTULO 2 - Caracterização mediante uso da retinografia, avaliação macroscópica e histomorfométrica da retina do Pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) .. | 20   |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                          | 22   |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                                   | 22   |
| 3. RESULTADOS.....                                                                                                                                           | 24   |
| 3.1. Retinografia .....                                                                                                                                      | 24   |
| 3.2. Observação macroscópica .....                                                                                                                           | 26   |
| 3.3 Aspectos histológicos .....                                                                                                                              | 30   |

|                     |    |
|---------------------|----|
| 4. DISCUSSÃO .....  | 34 |
| 5. CONCLUSÃO .....  | 36 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 37 |

### CAPÍTULO 3 - Efeitos da suplementação do camu-camu (*Myrciaria dubia*) sobre a retina de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) aloxano diabéticos.....39

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                            | 41 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS.....                                     | 42 |
| 2.1. Animais.....                                              | 42 |
| 2.2. Camu-camu ( <i>Myrciaria dubia</i> ) .....                | 42 |
| 2.3. Preparação da dieta .....                                 | 43 |
| 2.4. Avaliação das condições basais relativas à glicemia ..... | 43 |
| 2.5. Indução do diabetes .....                                 | 43 |
| 2.6. Estudo piloto .....                                       | 43 |
| 2.7. Delineamento experimental.....                            | 44 |
| 2.8. Protocolos de avaliação oftálmica.....                    | 44 |
| 2.8.1 Padronização da técnica de eletrorretinografia .....     | 45 |
| 2.8.2 Retinografia.....                                        | 45 |
| 2.9. Eutanásia e colheita dos olhos.....                       | 46 |
| 2.10. Histomorfometria.....                                    | 46 |
| 2.11. Histopatologia e IQ.....                                 | 47 |
| 2.12. Avaliação do índice apoptótico (Teste TUNEL).....        | 47 |
| 2.13. Estatística.....                                         | 48 |
| 3. RESULTADOS.....                                             | 48 |
| 3.1. Eletrorretinografia (ERG) .....                           | 48 |
| 3.2. Retinografia .....                                        | 52 |
| 3.3. Histopatologia e IQ .....                                 | 54 |
| 4. DISCUSSÃO .....                                             | 72 |
| 5. CONCLUSÕES.....                                             | 77 |
| 6. REFERÊNCIAS.....                                            | 78 |

**CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****DECLARAÇÃO**

Declaramos que o trabalho de pesquisa intitulado "Efeito neuroprotetor, sobre a retina, da suplementação de camu-camu (*Myrciaria dúbia*) na dieta de Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) aloxana-diabéticos", sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Laus e Certificado CEUA protocolo nº 18718/17, teve mudança de orientação para Prof. Dr. Fabrício Singaretti de Oliveira, aprovado em reunião ordinária de 04 de julho de 2019.

Jaboticabal, 04 de julho de 2019.

**Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski**  
Coordenadora – CEUA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE CAMU-CAMU (*MYRCIARIA DUBIA*) NA  
DIETA DE PACUS (*PIARACTUS MESOPOTAMICUS*) ALOXANO-DIABÉTICOS  
SOBRE A RETINA**

**RESUMO** - As retinopatias diabéticas despontam como causa importante de cegueira em humanos, notadamente em países não desenvolvidos e são caracterizadas pela presença de lesões microvasculares e degeneração. Os antioxidantes representam alternativa terapêutica a essa condição, por diminuir o risco de perda da visão e o desenvolvimento de retinopatias. O camu-camu (*Myrciaria dubia*) é um fruto da selva Amazônica, pertencente à família da Myrtaceae e contém grandes concentrações de vitamina C. O escopo deste trabalho foi o de estudar os efeitos de uma dieta enriquecida pelo camu-camu na retina de peixes aloxano-diabético. O estudo foi composto por peixes pacus (*Piaractus mesopotamicus*) de 213,87gramas, machos e fêmeas, distribuídos em 6 grupos (n=40): Três grupos não diabéticos (ND0, ND500 e ND1000) e três grupos diabéticos (D0, D500 e D1000). Foram administradas concentrações de camu-camu de 500 e de 1000mg nos dois grupos respectivamente. Avaliou-se seu efeito sobre a retina possíveis alterações e nível de RDNP (retinopatia diabética não proliferativa) mediante eletrorretinografia e retinografia, morfologia, histopatologia, imuno-histoquímica e apoptoses. Todos os pacientes induzidos à diabetes apresentaram lesões severas de RDNP. Aumento de escore a RDNP foi observado entre o grupo relativamente ao grupo ND com escore (0). Foram observadas diferenças significativas do escore de risco nos grupos D1000 versus os grupos controles com escore 2.83 e 0 respectivamente. Apresentando uma tendência menor as severidades de RDNP nos pacientes de D500. Relativamente à eletrorretinografia, o tempo implícito da onda b para os bastonetes foi significativamente mais baixo no grupo D500 quando comparados os grupos ND0 e ND500. A morfometria revelou que o grupo D0 teve diminuição significativa da espessura da retina total e posterior assim como da camada dos fotorreceptores ao ser comparado com o grupo ND0. O grupo D0 diminuiu significativamente a camada do epitélio pigmentário e dos fotorreceptores ao ser comparado com o ND500. Ademais, o grupo D1000 apresentou maior espessura do que os grupos D0 e o D500. Uma tendência de maior marcação no escore final para o índice apoptótico, caspase-3 e caspase-9 no grupo D0 e menor marcação em D500 e D1000. Os achados sugerem que o camu-camu mostrou ação neuroprotetora beneficiando no tecido retinal do pacu.

**Palavras-chave:** antioxidante, diabetes, neuroprotetor, pacu, retina

## EFFECTS OF CAMU-CAMU (*MYRCIARIA DUBIA*) SUPPLEMENTATION ON THE DIET OF PACUS (*PIARACTUS MESOPOTAMICUS*) ALOXAN-DIABETICS ON THE RETINA

**ABSTRACT** - Diabetic retinopathies are a major cause of blindness in humans, especially in undeveloped countries, and are characterized by the presence of microvascular lesions and degeneration. Antioxidants represent a therapeutic alternative to this condition by reducing the risk of vision loss and development of retinopathies. Camu-camu (*Myrciaria dubia*) is a fruit of the Amazon jungle, which belongs to the Myrtaceae family and contains high concentrations of vitamin C. The scope of this work was to study the effects of a diet enriched by camu-camu on the retina of aloxane-diabetic fish. The study was composed of male and female pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) of 213.87grams, distributed in 6 groups (n=40): Three non-diabetic groups (ND0, ND500 and ND1000) and three diabetic groups (D0, D500 and D1000). 500 and 1000mg concentrations of Camu-camu were administered to the two groups, respectively. Their effect on the retina regarding possible alterations and level of RDNP (non-proliferative diabetic retinopathy) was evaluated by means of electro-retinography and retinography, morphology, histopathology, immunohistochemistry and apoptosis. All diabetes-induced patients had severe lesions of RDNP. Increased RDNP score was observed in all D groups compared to ND group with score (0). Significant differences in risk score were observed in groups D1000 versus control groups with score 2.83 and 0, respectively. RDNP severity presented a lower tendency in D500 patients. Regarding electro-retinography, the implicit b wave time for rods was significantly lower in group D500 when compared to groups ND0 and ND500. Morphometry revealed that group D0 had a significant decrease in the thickness of total and posterior retina as well as the photoreceptor layer when compared to group ND0. Group D0 significantly decreased the pigment epithelium and photoreceptor layer when compared to the ND500. In addition, Group D1000 was thicker than Groups D0 and D500. There was a tendency of higher marking for apoptotic index, caspase-3 and caspase-9 in group D0 and lower marking in D500 and D1000. The findings suggest that the camu-camu showed neuroprotective action benefiting the retinal tissue of pacu.

**Keywords:** antioxidant, diabetes, neuroprotective, pacu, retina

## LISTA DE ABREVIATURAS

|        |                                                      |
|--------|------------------------------------------------------|
| AGES   | Glicosilação de produtos avançados                   |
| ANOVA  | Análise de Variância                                 |
| ARVO   | Animals in Ophthalmic Vision and Research            |
| CNI    | Camada nuclear interna                               |
| CNE    | Camada nuclear externa                               |
| CPI    | Camada plexiforme interna                            |
| DM     | Diabetes mellitus                                    |
| ER     | Endoplasmic reticulum                                |
| ERG    | Eletrorretinografia                                  |
| FGEV   | Fator de crescimento endotelial vascular             |
| GLP- 1 | Peptídeo tipo glucagon                               |
| HE     | Técnica de coloração em hematoxilina e eosina        |
| HPLC   | Cromatografia líquida de alta eficiência             |
| IDF    | “International Diabetes Federation”                  |
| IGF-1  | Fator de crescimento insulínico tipo 1               |
| IRMA   | Anormalidades microvasculares intraretinais          |
| mmHg   | Milímetros de mercúrio                               |
| OD     | Oxigênio dissolvido                                  |
| PACAP  | Peptídeo ativador da adenilato ciclase na pituitária |
| PEDF   | Fator derivado do epitélio pigmentário               |
| PIO    | Pressão intraocular                                  |
| RD     | Retinopatia diabética                                |
| RDNP   | Retinopatia diabética não proliferativa              |
| RDP    | Retinopatia diabética proliferativa                  |
| RAS    | Sistema renina-angiotensina                          |
| ROS    | Espécies reativas de oxigênio                        |
| TRO    | Diâmetro antero posterior do olho                    |
| Uv     | Microvolts                                           |
| WHO    | World Health Organization                            |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 1  |
| CAPÍTULO 2 - Caracterização mediante uso da retinografia, avaliação macroscópica e histomorfométrica da retina do Pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) ..                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 20 |
| Figura 1. Imagem de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) demonstrando contenção manual para a realização do exame de retinografia. Em A: observe-se o posicionamento horizontal para o olho estar totalmente iluminado e favorecer a imagem da retina na sua total extensão. Em B: note-se o posicionamento do peixe junto à lente auxiliar para o registro das imagens. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019. ....                                                                                                                                                                                                                                          | 25 |
| Figura 2. Imagem representativa do fundo do olho e nervo óptico do pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ). A: Observa-se a vasculatura dicotomizada da região de retina central (setas finas), o vaso maior calibre (seta maior) e o processo falciforme (seta branca). Em B: apresenta-se em detalhe uma parte da retina central com seu processo falciforme (seta). Laboratório de Oftalmologia Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.....                                                                                                                                                                                                            | 25 |
| Figura 3. Imagem macroscópica representativa do olho do pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ). Em A: Vista posterior, note-se o posicionamento centralizado do nervo óptico (NO). Em B: retina completa após retirar o botão corneal, observa-se o detalhe da região tapetal (estrela preta), não tapetal (estrela branca) e processo falciforme (linha preta). Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019. ....                                                                                                                                                                                                                                                               | 26 |
| Figura 4. Imagem comparativa do fundo do olho do pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) Em A: Imagem registrada mediante o retinógrafo, observa-se ao detalhe de uma predominante região tapetal (estrela preta), a vasculatura dicotomizada (seta preta) e o processo falciforme (seta branca) na região ventral. Em B; imagem macroscópica após enucleação (sem o botão corneal) observa-se a região tapetal (estrela preta), não tapetal (círculo), o processo falciforme (seta branca) e o nervo óptico alongado paralelo ao processo falciforme de cor cinza (seta preta). Laboratório de Oftalmologia Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019. .... | 27 |
| Figura.5. Imagem representativa dos dois nervos ópticos divulsionados (seta branca e preta). Laboratório de Oftalmologia Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 28 |



|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 6. Imagem representativa da inserção de ambos os ramos nervos (estrela branca). Laboratório de Oftalmologia Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, FCAV-Unesp, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 28 |
| Figura 7. Imagem representativa do trajeto do nervo maior em direção ventral (estrela branca). Junção dos dois nervos (estrela preta). Laboratório de Oftalmologia Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, FCAV-Unesp, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 29 |
| Figura 8. Olho divulsionado. Observa-se o recorrido do nervo óptico em direção ventral (seta branca). Laboratório de Oftalmologia Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, FCAV-Unesp, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 29 |
| Figura 9. Anatomia macroscópica e histológica do olho do pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ). Em A, corte parasagital de um dos olhos fixados em formaldeído sendo visíveis: córnea (c), a íris (i), o vítreo (v), a retina (R), a rete mirabile coróide (CR), com abundante gordura (*), o nervo óptico (NO). Em B: corte histológico parasagital (coloração de hematoxilina e eosina, 40X) em toda sua extensão de ora serrata a ora serrata (OS) e o nervo óptico (NO). Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019. .... | 31 |
| Figura 10. Corte transversal da retina do pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) (coloração de hematoxilina e eosina, 20X). Observa-se o EP: epitélio pigmentário; F: fotorreceptores; NE: camada nuclear externa; PE: camada plexiforme externa; NI: camada nuclear interna; PI: camada plexiforme interna, CG: células ganglionares; FN: Fibras nervosas (coloração de hematoxilina e eosina, 20x). Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019. ....                                                                         | 31 |
| Figura 11. Espessura total da retina do pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) (coloração de hematoxilina e eosina, 20X). Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 32 |
| Figura 12. Nervos ópticos do pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ). Observa-se a junção dos dois nervos ópticos (seta preta), mais curto (estrela branca) e mais longo (estrela preta). Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 33 |
| Figura 13. Segmentos do nervo óptico do pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ). A: Note-se os dois segmentos um nervo menor (estrela branca) e um nervo maior (estrela preta) B: trajeto do nervo maior (estrela preta). C: Detalhe da separação dos segmentos nervo menor (estrela branca) e nervo maior (estrela preta) (40X). Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019. ....                                                                                                                                              | 33 |
| Figura 14. Processo falciforme do pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ). Note-se a presença do músculo retrator (estrela) junto ao processo falciforme (seta). Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 34 |
| <br>CAPÍTULO 3 - Efeitos da suplementação do camu-camu sobre a retina ( <i>Myrciaria dubia</i> ) de pacus ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) aloxano diabéticos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 39 |

- Figura 1. Sequência da realização do ERG no pacu. 1: adaptação em ambiente ao escuro sob anestesia em um sistema recirculação simples com o uso do HMSeRG em pacu anestesiado. 2: adaptação a fase clara. 3: posicionamento sobre uma esponja molhada do pacu durante a realização do ERG. 4: ERG na a fase escura observa-se o posicionamento do tubo inserido na cavidade bucal durante a anestesia de manutenção. 5: Vista frontal do pacu entubado sob anestesia de manutenção e posicionamento do eletrodo terra às 6 horas. 6: Vista lateral do posicionamento dos três eletrodos do ERG no pacu anestesiado. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019. ....49
- Figura 2. Eletroretinograma em flash, durante a fase de adaptação escotóptica de baixa amplitude em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem tratamento), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. ....50
- Figura 3. Eletroretinograma em flash, durante a fase de adaptação escotóptica de alta amplitude em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem tratamento), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. ....51
- Figura 4. Eletroretinograma flash, durante a fase clara (cones), em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem tratamento), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. ....52
- Figura 5. Imagens fotográficas colhidas de pacus submetidos à retinografia. Em A: animal sob contenção manual para a realização do exame. Em B: Observa-se o posicionamento do peixe adjunto à lente auxiliar para o registro das imagens. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019. ....53
- Figura 6. Imagem representativa dos fundos dos olhos do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com camu-camu. com as características das alterações de vascularização segundo o seu grupo correspondente e presença do processo falciforme na região dorsal. FCAV-Unesp, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil. Note-se a retina centralizada. ....53
- Figura 7. Fotomicrografia de cortes (5µm) de retinas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Em A: porção da retina posterior com a cabeça do nervo óptico (coloração de hematoxilina e eosina, 10X) B: Observa-se

- a ora serrata (coloração de hematoxilina e eosina, 40X) (seta). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.....54
- Figura 8. Fotomicrografia de corte (5µm) de retina de pacu (coloração de hematoxilina e eosina, 20X). Notem-se o EP: epitélio pigmentário; F: fotorreceptores; NE: camada nuclear externa; PE: camada plexiforme externa; NI: camada nuclear interna; PI: camada plexiforme interna, CG: células ganglionares; FN: Fibras nervosas de peixes pacus (*Piaractus mesopotamicus*). Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. ....55
- Figura 9. Fotomicrografia de retina no pacu (*Piaractus mesopotamicus*) representando as regiões estudadas por campo, para a avaliação da espessura total da retina em pacus. **RP**: retina posterior em contato com o nervo óptico, **RM**: retina média ou intermedia e **RA**: retina anterior em direção ao corpo ciliar. FCAV- Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020. ....55
- Figura 10. Médias e erro padrão relativos à espessura da retina total em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem tratamento), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. \*Médias seguidas de pelo menos por uma letra maiúscula em comum não diferiram estatisticamente ( $p>0,05$ ). ....56
- Figura 11. Médias e erro padrão relativos à espessura da retina posterior em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem tratamento), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. \*Médias seguidas de pelo menos por uma letra maiúscula em comum não diferiram estatisticamente ( $p>0,05$ ). ....57
- Figura 12. Médias e erro padrão da espessura da retina anterior em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (sem suplementação), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem tratamento), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. \*Médias seguidas de pelo menos por uma letra maiúscula em comum não diferiram estatisticamente ( $p>0,05$ ).....58
- Figura 13. Médias e erro padrão relativos à espessura da camada do epitélio pigmentar em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem tratamento),

D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. \*Médias seguidas de pelo menos por uma letra maiúscula em comum não diferiram estatisticamente..59

Figura 14. Médias e erro padrão relativos à espessura da camada dos fotorreceptores em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem suplementação), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. \*Médias seguidas de pelo menos por uma letra maiúscula em comum não diferiram estatisticamente ( $p>0,05$ ).....60

Figura 15. Médias e erro padrão relativos à espessura da camada nuclear externa em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem suplementação), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. \*Médias seguidas de pelo menos por uma letra maiúscula em comum não diferiram estatisticamente ( $p>0,05$ ).....61

Figura 16. Médias e erro padrão relativos à espessura da camada plexiforme externa em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem suplementação), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. \*Médias seguidas de pelo menos por uma letra maiúscula em comum não diferiram estatisticamente ( $p>0,05$ ).....62

Figura 17. Médias e erro padrão relativos à espessura da camada nuclear interna em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem suplementação), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. \*Médias seguidas de pelo menos por uma letra maiúscula em comum não diferiram estatisticamente ( $p>0,05$ ).....63

Figura 18. Médias e erro padrão relativos à espessura da camada plexiforme interna em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e

diabéticos representados por: D0 (sem suplementação), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. \*Médias seguidas de pelo menos por uma letra maiúscula em comum não diferiram estatisticamente ( $p>0,05$ ).....64

Figura 19. Caspase-3 CNE. (A) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (B) Escore final 4 (distribuição do escore 2, intensidade score 2); (C) Escore final 2 (distribuição do escore 1, intensidade score 2); (D) Escore final 2 (distribuição do escore 1, intensidade score 2); (E) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (F) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); DAB peroxidase contra coloração hematoxilina magnificação 40X. ....67

Figura 20. Caspase-3 CNI. (A) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (B) Escore final 6 (distribuição do escore 3, intensidade score 2); (C) Escore final 2 (distribuição do escore 1, intensidade score 2); (D) Escore final 2 (distribuição do escore 2, intensidade score 1); (E) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (F) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); DAB peroxidase contra coloração hematoxilina magnificação 40X. ....68

Figura 21. Caspase-9 CNE. (A) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (B) Escore final 2 (distribuição do escore 1, intensidade score 2); (C) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (D) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (E) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (F) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); DAB peroxidase contra coloração hematoxilina magnificação 40X. ....69

Figura 22. Caspase-9 CNI. (A) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (B) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (C) Escore final 2 (distribuição do escore 1, intensidade score 2); (D) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 2); (E) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (F) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); DAB peroxidase contra coloração hematoxilina magnificação 40X. ....70

Figura 23. Índice apoptótico na retina. Observa-se o incremento significativo nos grupos D0, D500 e D1000 quando comparado com o grupo ND0. Medias e erro padrão seguidas por letras iguais não diferem significativamente de outro por teste Kruskal-Wallis ( $p<0.05$ ). ....72

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais.....                                                                                                                           | 1  |
| CAPÍTULO 2 - Caracterização mediante uso da retinografia, avaliação macroscópica e histomorfométrica da retina do Pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) ..     | 20 |
| Tabela 1. Médias e erro padrão da espessura da retina e suas camadas ( $p < 0.05$ )..                                                                            | 32 |
| CAPÍTULO 3 - Efeitos da suplementação do camu-camu sobre a retina ( <i>Myrciaria dubia</i> ) de pacus ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) aloxano diabéticos..... | 39 |
| Tabela 1. Classificação clínica de RDNP no pacu diabético considerada para as avaliações à retinografia .....                                                    | 46 |
| Tabela 2. Valores do ERG em pacus, apresentados como médias e erro padrão da amplitude do ERG e tempo implícito da fase escotópica (bastonetes).<br>.....        | 50 |
| Tabela. 3. Valores do ERG em pacus, apresentados como médias e erro padrão da amplitude do ERG e tempo implícito da fase escotópica (mista). ....                | 51 |
| Tabela 4. Valores do ERG em pacus, apresentados como médias e erro padrão da amplitude do ERG e tempo implícito da fase fotópica (cones).....                    | 51 |
| Tabela 5. Escore clínico de lesões (média $\pm \sigma$ ) em pacus suplementados com extrato seco de camu-camu.....                                               | 54 |
| Tabela 6. Espessura da retina total em pacus suplementados com camu-camu.....                                                                                    | 56 |
| Tabela 7. Espessura da retina posterior em pacus suplementados com camu-camu.<br>.....                                                                           | 57 |
| Tabela 8. Espessura da retina anterior em pacus suplementados com camu-camu.                                                                                     | 58 |

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 9. Espessura do epitélio pigmentado em pacus suplementados com camu-camu. ....                       | 59 |
| Tabela 10. Espessura dos fotorreceptores em pacus suplementados com camu-camu. ....                         | 60 |
| Tabela 11. Espessura da camada nuclear externa em pacus suplementados com camu-camu. ....                   | 61 |
| Tabela 12. Espessura da camada plexiforme externa em pacus suplementados com camu-camu. ....                | 62 |
| Tabela 13. Espessura da camada nuclear interna em pacus suplementados com camu-camu. ....                   | 63 |
| Tabela 14. Espessura da camada plexiforme interna em pacus suplementados com camu-camu. ....                | 64 |
| Tabela 15. Quantificação de vasos abertos colapsados e estreitos em pacus suplementados com camu-camu. .... | 65 |
| Tabela. 16. Escore de imuno-histoquímica nas camadas nuclear externa (CNE) e interna de retinas (CNI). .... | 71 |
| Tabela 17. Escore de imuno-histoquímica nas camadas nuclear externa (CNE) e interna (CNI). ....             | 71 |

## CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais

### 1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença multifatorial de importante repercussão, principalmente em países em desenvolvimento. Entre as complicações mais comuns na saúde ocular, a cegueira manifesta-se frequentemente por causa da degeneração na retina adjunto às lesões micro e macro vasculares. A hiperglicemia altera o metabolismo da matriz extracelular das células de uma variedade de tecidos, incluindo os oculares. O DM favorece o estresse oxidativo e a glicosilação de macromoléculas da membrana basal de diversas células.

Os antioxidantes têm sido utilizados como terapia de apoio para diversas enfermidades tanto em humanos quanto em animais. Esses fármacos podem modular os radicais livres do estresse oxidativo, produtos das células condicionadas sob hiperglicemia permanente, que danifica as células retiniais. O camu-camu (*Myrciaria dubia*) é um nutracêutico reconhecido por sua exacerbada concentração de vitamina C, apresentando, portanto, propriedades antioxidantes, que favorecem o sistema imune e atua sobre rotas metabólicas do diabetes. Ainda não fora avaliado o seu efeito neuroprotetor adjunto às avaliações clínicas de rotina e análises histopatológicas. Contudo, considera-se que seu uso possa compor o arsenal terapêutico do protocolo de tratamento do diabetes, principalmente nos primeiros estádios da doença, devido às características citadas e facilidade de administração, por ser acessível e de baixo custo.

O presente estudo tem como objetivo, avaliar os efeitos do camu-camu (*Myrciaria dubia*) sobre a retina com possíveis alterações e nível de RDNP (retinopatia diabética não proliferativa) mediante eletrorretinografia e retinografia, morfologia, histopatologia, imuno-histoquímica e apoptoses de pacus aloxana-diabéticos.



## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Diabetes mellitus (DM)**

O DM é um grupo de transtornos metabólicos caracterizado pela hiperglicemia como resultado de uma disfunção na homeostase da glicose (Kalra e Gupta, 2015). A prevalência do DM (tipo I e tipo II) no mundo, reportada pelo International Diabetes Federation (IDF), é de 473 milhões de pessoas (entre 20 e 79 anos), e para 2045 estima-se que chegue a 700 milhões de pessoas (IDF, 2019). Os sinais clínicos mais comuns são poliúria, polidipsia e polifagia. Enquanto acontece a ativação de mecanismos exacerbados de glicogenólise e gliconeogênese com a utilização de aminoácidos, e a pouca utilização de glicose celular, assim, o resultado será a presença da hiperglicemia (Bolton et al., 2016), a qual, se permanente, conduz a sérias complicações em humanos e animais (Niaz et al., 2018), causando doenças cardiovasculares, desordens renais e cegueira (WHO, 2016). O DM tipo I é uma condição autoimune e é definida pela destruição de células  $\beta$  pancreáticas; o DM tipo II é associado à obesidade, falta de atividade física, alimentação não saudável ou parcial resistência da ação da insulina, desencadeando em ambos os casos um déficit de insulina (Cerf, 2013; IDF, 2019).

### **2.2. Modelos para estudos sobre DM**

O desenvolvimento da DM em pequenos animais e de animais de laboratório é similar em comparação aos humanos, o que tem motivado o seu uso para estudos e assim ampliar o conhecimento dos mecanismos da fisiopatologia, bem como encontrar novos alvos para testes farmacogenéticos a serem aplicados na terapêutica humana (Metz et al., 2016; Heckler e Kroll, 2017).

Tradicionalmente, a maioria das pesquisas tem sido desenvolvida com o uso de ratos ou camundongos. Considerando a manutenção e complexidade para trabalhar com essa espécie, a demanda de outros modelos de vertebrados tem sido considerada para doenças com repercussão ocular (Chhetri et al., 2014).

Comparativamente com os ratos, o *Zebrafish* (*Danio rerio*) é geneticamente manipulável, vantagem desejada para pesquisas metabólicas (Carnoali et al., 2016). O *Zebrafish* torna-se modelo reconhecido por suas semelhantes características anatômicas, morfológicas, genéticas e de função com o olho humano (Bibliowicz et al., 2011; Chhetri et al., 2014; Wan e Goldman, 2016). Entre outras vantagens, caracterizam-se por possuir visão diurna em cores com precisão visual menor em comparação com os humanos (Link e Collery, 2015). Além disso, eles refletem melhor as doenças oculares como: catarata, glaucoma, retinopatia diabética e degeneração macular relacionada à idade, quando comparados a outros modelos de pesquisa, como são os roedores (Chhetri et al., 2014). Portanto, considera-se o *Zebrafish* como modelo atrativo e emergente para a análises do sistema visual dos vertebrados (Avanesov e Malicki, 2010).

Protocolos estabelecidos para modificar os níveis de glicose foram estudados previamente nessa espécie. Destaca-se que as rotas metabólicas para desenvolver diabetes e formação de metabólitos são similares ao humano (Heckler e Kroll, 2017). Experimentalmente, a indução do diabetes tem sido proposta em diferentes fases do ciclo de vida do *Zebrafish*, com um protocolo de imersão em solução com níveis elevados de glicose durante 28 dias (Gleeson et al., 2007; Alvarez et al., 2010; Jörgens et al., 2015; Carnoali et al., 2016; Connaughton et al., 2016), a manipulação genética em fenótipos morfantes *pdx1* produzindo diabetes transitória (Jörgens et al., 2015) e a administração de agentes químicos que destroem as células beta pancreáticas desenvolveram DM tipo I (Intine et al., 2013), com agentes diabetogênicos, como a estreptozotocina e a aloxana (2,4,5, tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracil) (Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008, Cueva-Quiroz 2017).

Em 2010, Olsen et al. induziram diabetes com estreptozotocina em c adultos, produzindo morte de células pancreáticas. Por outro lado, estudos anteriores usaram aloxana para um modelo em Catfish (Murrell e Nace, 1959), reportando mudanças nas células beta pancreáticas. A aloxana apresenta citotoxicidade específica nas células beta pancreáticas, produzindo incremento rápido da secreção de insulina, simultâneo à entrada de íons cálcio no citosol, o que suscita danos vasculares das ilhotas pancreáticas e morte celular. Animais aloxano diabéticos desenvolvem

sintomas similares aos apresentados por seres humanos com DM tipo I (Lenzen, 2008).

O uso do *Zebrafish* para estudos de retinopatia diabética (RD) e complicações microvasculares é sustentada pela similar fisiologia e patologia vascular com os mamíferos (Alvarez et al., 2007; Heckler e Kroll, 2017). Vários são os modelos propostos que já foram desenvolvidos para melhor compreensão da degeneração retinal em diversas condições. Destaca-se que o *Zebrafish* desenvolve hiperglicemia após um dia da indução e, na quarta semana, manifesta diminuição de 55% na camada plexiforme interna (CPI) (Gleeson et al., 2007). Posteriormente, novos modelos de RD no *Zebrafish* afirmaram não ocorrer vascularização do plexo nervoso da camada plexiforme interna (CPI) quando comparados com humanos (Lai e Lo, 2013), no entanto, outras pesquisas reportaram um sistema vascular hialoide da artéria óptica e veia óptica e um sistema vascular superficial da vasculatura ocular superficial e o plexus venoso coroidal no *Zebrafish* (Hashiura et al., 2017). A degeneração de cones estabeleceu-se com alterações precedentes de espessamento de vasos retinais, membrana basal e descontinuidade da barreira hemato-retiniana em indivíduos da mesma espécie induzidos experimentalmente o diabetes (Alvarez et al., 2010).

Apesar das vantagens do uso do *Zebrafish*, como modelo de experimentação, seu porte pequeno inviabiliza a obtenção de sangue em estudos que requeiram fazer um seguimento do mesmo animal e uma avaliação oftalmológica *in vivo* (Chhetri et al., 2014).

Atualmente, não há um único modelo animal que mimetize todas as alterações que acontecem nos humanos, desde os estágios iniciais até os estágios crônicos, sendo a angiogênese ainda controversa em alguns modelos animais (Lai e Lo, 2013).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é um peixe teleósteo da família *Characidae*. Ele apresenta porte médio e ampla distribuição na América do Sul (Bennett e Thorpe, 2008). Ele é cultivado principalmente no Brasil, Paraguai, Bolívia e Argentina (IBGE, 2016). No Brasil, é uma das espécies mais difundidas na aquicultura (Jegú 2003). Destaca-se seu crescimento rápido, alto rendimento de carcaça, rusticidade, fácil manejo, adaptação à alimentação artificial e boa aceitação para o consumo (Jomori et al., 2005). Quando atinge a maturidade, seu comprimento é de 40.5 cm. Sua dieta

natural é baseada em grandes quantidades de carboidratos e frutas 50% (Garcia et al., 2007; Honorato et al., 2013), similarmente à dieta humana. Essa espécie pode contribuir para o estudo de DM relacionada às alterações oftálmicas e pode ser nova alternativa de modelo experimental em pesquisas futuras.

### 2.3. A retina

A retina é um tecido sensível à luz e responsável pela visão (Slatter, 2009). Ela e o nervo óptico são estruturas derivadas do encéfalo frontal, e têm características anátomo-fisiológicas semelhantes ao cérebro (Slatter, 2009). A retina liga-se ao córtex visual pelo nervo óptico, através do quiasma óptico, as fibras ópticas e o corpo geniculado lateral. Tem como função captar o estímulo luminoso e o transformá-lo em estímulo elétrico para ser transmitido ao córtex visual, onde ocorre a fototransdução (Slatter, 2009).

A retina é composta pelo epitélio pigmentar e a neuroretina, ou retina sensorial (Jones et al. 2000). Relativamente à retina dos peixes, assim como nos mamíferos, é composta por diferentes camadas, sendo variável entre as espécies (Salmão (*Salmo salar*), Cardinal (*P. axelrodi*), Zebrafish (*Danio reiro*), entre outros) (Tovar et al., 2009; Pellón et al., 2015). O epitélio pigmentar tem o papel de controlar a quantidade de luz que ingressa (Herrera, 2008).

Enumeram-se do meio externo para o interno, as camadas que conformam a neuroretina: fotorreceptores (cones e bastonetes), membrana limitante externa, camada nuclear externa (que contém os núcleos dos fotorreceptores), camada plexiforme externa, camada nuclear interna, camada plexiforme interna, células ganglionares, camada de fibras nervosas e a membrana limitante interna (Ferguson, 2006; Herrera, 2008).

A camada dos fotorreceptores, denominada lâmina dos cones e bastonetes, que contém seus segmentos externos e internos, é a membrana limitante externa. Diferentes tipos de cones estão presentes em algumas espécies de peixes, simples, binucleados ou trinucleados, característicos dos teleósteos (Ferguson, 2006). A membrana limitante é uma fina membrana dos fotorreceptores que separa a lâmina nuclear dos seus segmentos internos. A camada nuclear externa apresenta os núcleos dos fotorreceptores, que são conectados com os seus segmentos internos. A

camada plexiforme externa se compõe das sinapses dos axônios fotorreceptores e dos processos celulares de Müller. A camada nuclear interna é estruturalmente complexa composta pelos corpos celulares das células de Müller, assim como das células amácrinas, horizontais e bipolares (Ferguson, 2006).

A camada plexiforme interna é composta pelas sinapses de células amácrinas e bipolares e células ganglionares (Ferguson, 2006; Tovar et al., 2009). A camada ganglionar é conformada por células ganglionares e da neuroglia. A camada de fibras nervosas composta pelos axônios das células ganglionares e terminais das células de Müller (Ferguson, 2006). A membrana limitante interna é formada pelas terminações fusionadas das células de Müller e elementos vítreos. (Herrera, 2008) O *tapetum lucidum*, encontra-se atrás dos fotorreceptores e sua posição (na coroide ou relacionados ao epitélio pigmentar), e características variam entre as diferentes espécies de peixes (Ferguson, 2006).

#### **2.4. Neuroregeneração e estresse oxidativo no DM**

A neuroregeneração refere-se ao recrescimento e alongação dos axônios nervosos ópticos alterados, correspondentes às células ganglionares, com corpos celulares saudáveis e a sua reconexão ao alvo neural (Brooks et al., 1999). Os peixes têm a particularidade de desenvolver regeneração espontânea do seu sistema nervoso central, que é mediada por fatores presentes nos macrófagos e astrócitos, ativados em seu nervo óptico (Sivron et al., 1991; Cameron e Easter, 1995; Genberling et al., 2013). Outros sugerem que a regeneração é predominantemente por ablação neuronal (Fraser et al., 2013). Pesquisas consideram que a natureza das células glias de Müller é ser multipotente, o que as condiciona como responsáveis pela regeneração da maioria dos tipos celulares (Bernardos et al., 2007; Wan e Goldman, 2016). Estudos prévios já foram conduzidos no *Zebrafish* com dano agudo em cones e bastonetes com evidências da sua regeneração, assim como de outros tipos celulares (Cameron e Easter, 1995; Morris et al., 2008). São cada vez maiores as evidências que os pacientes diabéticos são propensos a sofrer doenças cerebelares. Nesse contexto, o *Zebrafish* tem se destacado como modelo para pesquisas em neurogenese de injúria induzida por apresentar características nas células glias que são comparadas com as células mães (Dorseman et al.; 2017).

O estresse oxidativo define-se como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são oriundos do próprio mecanismo de defesa, antioxidante do corpo adjunto a uma redução da ação dos antioxidantes (De Araújo et al., 2016). O papel dos ROS é regular as funções celulares. Seu equilíbrio homeostático é mediado por um mecanismo de defesa endógeno contra os antioxidantes, sendo essas categorias de defesa envolvidas por proteínas antioxidantes como: antioxidantes em pequenas moléculas e antioxidantes enzimáticos (Halliwell, 1999; Opara, 2006). Mecanismos moleculares específicos dos antioxidantes são ativados para equilibrar os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo. Os antioxidantes são substâncias que têm a capacidade de retardar ou prevenir a oxidação de proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos ou hidratos de carbono. Durante o processo de depuração são produzidas substâncias mais estáveis ao entrar em contato com um radical (Hermans et al., 2007). Ressaltam-se seu papel protetor sobre as células expostas aos prejuízos do estresse oxidativo em condições de hiperglicemia (West, 2000; Martínez-González et al., 2015).

## **2.5. Diabetes mellitus, retinopatia e neuroproteção**

Os fatores relacionados à ação dos xenobióticos, derivados da poluição ambiental, incremento da intensidade da radiação ultravioleta, alimentação à base de gorduras e hidratos de carbono associados à inatividade física e aumento de doenças degenerativas como o diabetes mellitus, constituem fatores de risco para a apresentação de retinopatias (Willcox et al., 2004; Karihtala e Soini, 2007; McMichael, 2007). Tais fatores possuem a capacidade de gerar substâncias oxidantes e de atingir tecidos oculares (Campochiaro et al., 2015). A hiperglicemia resultante do DM induz severos danos na retina (Carnovali et al., 2016; Gleeson et al., 2007). Sua natureza, por ser um tecido altamente oxidativo e com uma demanda alta de oxigênio e produtos ROS, os quais são incrementados em condições de diabetes (Chen et al., 2009; Pearsall et al., 2019) tornam esse microambiente prejudicial.

A retinopatia diabética (RD) é uma das complicações mais comuns no diabetes que evolui para a cegueira (Hernández et al., 2016). Clinicamente é dividida em retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) e retinopatia diabética proliferativa (RDP) (Alvarez et al., 2010). A primeira manifesta-se nos estádios iniciais e

caracteriza-se pela presença em diferentes graus de alterações vasculares (microaneurismas, hemorragias, manchas de algodão, IRMAS (diminuição do calibre vascular e tortuosidade de vasos), vênulas em formato de rosário) e a segunda pela neovascularização associada a alguns dos eventos anteriores (Gibelalde et al., 2010; Berco et al., 2015). Essencialmente, a RD caracteriza-se pela neurodegeneração da retina, complicações vasculares nos capilares retiniais, a perda dos pericitos e o engrossamento das membranas basais (Simo et al., 2006; Hernández et al., 2016; Sohn et al., 2016). A presença do estresse oxidativo que em estádios iniciais exacerba a disfunção endotelial e os mecanismos metabólicos que envolvem o dano celular (Suganya et al., 2016). Estudos prévios mostraram que a neurodegeneração da retina precede e contribui para as disfunções microvasculares, assim como a neovascularização (Barber et al., 1998; Stem e Gardner, 2013; Sohn et al., 2016).

Há diversos eventos que sugerem as causas da neurodegeneração no diabetes: a) glicosilação de produtos avançados (AGES); b) excitotoxicidade do glutamato, c) vias intracelulares d) estresse oxidativo, e) desregulação do sistema renina-angiotensina (RAS), f) neuroinflamação, g) estresse do reticulo endoplasmático (ER) e h) desregulação dos neuroprotetores endógenos (Hernández et al., 2016).

Na procura por terapias baseadas na neuroproteção para o controle da degeneração retinal, antes que apareçam lesões vasculares (Hernández et al., 2016) novos estudos vêm sendo conduzidos. Entre os fármacos estudados, os nutracêuticos, como os antioxidantes, a luteína e as xantinas, mostraram ter ação sobre a mácula em seres humanos com estresse oxidativo. Elas agem sobre a redução dos ROS, portanto, podem reverter algumas alterações acidentais ou patológicas na retina (Arunkumar et al., 2020).

## **2.6. Camu-camu (*Myrciaria dubia*) e diabetes**

Instaurar precocemente um tratamento com novos fármacos que ofereçam proteção retinal em pacientes diabéticos é fundamental na primeira etapa da retinopatia, antes que esta venha a se tornar um evento crônico (Chhablani et al., 2015). A terapêutica disponível abarca substâncias endógenas, carotenoides, flavonoides, entre outros (Hernández et al., 2016).

Dentre as substâncias endógenas mais estudadas, estão a insulina, o fator de crescimento insulínico (IGF-1), o fator de crescimento endotelial vascular (VEFG) o fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF), o peptídeo ativador da adenilato ciclase na pituitária (PACAP), e o peptídeo tipo glucagon (GLP-1) (Reiter et al., 2003; Hernández et al., 2016). Substâncias como os flavonoides (Majumdar S e Srirangam R 2016), quercetina (Kumar et al., 2014), carcumina, (Gupta et al., 2011), carotenoides como luteína e zantinas (Kowluru et al., 2014) e antioxidantes como o resveratrol (Ghadiri Soufi et al., 2015) tem sido testado como neuroprotetores.

As terapias atuais nos pacientes diabéticos são focadas principalmente em regular a glicemia, e não tem efeito algum sobre as alterações produzidas na retina. Além disso, são necessários testes padronizados para constatar o potencial dos antioxidantes, com o intuito de tratar o estresse oxidativo que não pode ser clinicamente observável (Mcmichael, 2007). Pesquisas têm sido realizadas, relativas à aplicação de novos fármacos a base de antioxidantes inovadores e naturais, extraídos de frutos, os quais são opção acessível e de baixo custo (Wang et al. 2016; Zeng et al. 2016).

O camu-camu (*Myrciaria dubia*) é um fruto da Amazônia, pertencente à família *Myrtaceae* (Yuyama et al. 2002) e caracteriza-se por conter alta concentração de vitamina C (>2,0 g/100 g de polpa) (Castro et al., 2013; Nascimento et al., 2013), além de flavonoides e antocianinas (De Souza et al., 2014; Neves et al., 2015; Anhê et al., 2019). Ele atua contra radicais livres, contra efeitos produzidos pela radiação ultravioleta e contra patógenos (Wang et al., 2011). De Souza et al., (2014), demonstraram sua atividade antioxidante no plasma em ratos diabéticos, suplementados oralmente com esse fruto encontrando uma redução de triglicerídeos, colesterol e peroxidação de lipídeos e prevenir a obesidade. A substância também demonstrou ter uma ação anti-hipertensiva em humanos jovens (Miyashita et al., 2017).

Observou-se, ainda, com a suplementação de camu-camu na dieta de tilápias-do-Nilo (Yunis-Aguinaga et al., 2016), efeitos sobre a resposta imune, e que a substância contém inibidores de aldose redutase, cuja atividade é importante na patogênese do diabetes (Ueda et al., 2004).



### 3. REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

Alvarez Y, Cederlund ML, Cottell DC, Bill BR, Ekker SC, Torres-Vazquez J, Weinstein BM, Hyde DH, Vihtelic TS, Kennedy BN (2007) Genetic determinants of hyaloid and retinal vasculature in zebrafish. **BMC Developmental Biology** 7:1-17.

Alvarez Y, Chen K, Reynolds AL, Waghorne N, O'Connor JJ, Kennedy BN (2010) Predominant cone photoreceptor dysfunction in a hyperglycaemic model of non-proliferative diabetic retinopathy. **Disease Models & Mechanisms** 3: 236-245.

Anhê FF, et al. (2019) Treatment with camu-camu (*Myrciaria dubia*) prevents obesity by altering the gut microbiota and increasing energy expenditure in diet-induced obese mice. **Gut microbiota** 68:453-464.

Arunkumar R, Gorusupudi A, Bernstein PS (2020) The macular carotenoids: A biochemical overview. **Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Biololy of Lipids** 1-39.

Avanesov A, Malicki J (2010) Analysis of the Retina in the Zebrafish Model. **Methods in Cell Biology** 100: 153-204.

Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW (1998) Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes: Early onset and effect of insulin. **Journal of Clinical Investigation** 102:783-791.

Bennett E, Thorpe A (2006) Review of River Fisheries Valuation in Central and South America. **Tropical River Fisheries Valuation: A Global Synthesis and Critical Review** 1: 1-46.

Berco E, Rappoport D, Pollack A, Kleinmann G, Greenwald Y (2015) Management of Diabetic Retinopathy and Other Ocular Complications in Type 1 Diabetes. **Major Topics in Type 1 Diabetes** 3:31-61.

<sup>1</sup>ABNT-NBR 6023/2002; [http:// www.abntcolecao.com.br](http://www.abntcolecao.com.br)

Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, Raymond PA (2007) Late-Stage Neuronal Progenitors in the Retina Are Radial Muller Glia That Function as Retinal Stem Cells. **The Journal of Neuroscience** 27: 7028-7040.

Bibliowicz J, Tittle RK, Gross JM (2011) Towards a better understanding of human eye disease: insights from the zebrafish, *Danio rerio*. **Progress in Molecular Biology and Translational Science** 100:287-330.

Bolton TA, Cook A, Steiner JM, Fosgate GT (2016) Pancreatic Lipase Immunoreactivity in Serum of Dogs with Diabetic Ketoacidosis. **Journal of veterinary internal medicine** 30:958-963.

Brooks DE, Komáromy AM, Källberg ME (1999) Comparative optic nerve physiology: Implications for glaucoma, neuroprotection, and neuroregeneration. **Veterinary Ophthalmology** 2:13-25.

Cameron DA, Easter SS (1995) Cone photoreceptor regeneration in adult fish retina: Phenotypic determination and mosaic pattern formation. **Journal of Neuroscience** 15:2255-2271.

Campochiaro PA, Strauss RW, Lu L, Hafi G, Wolfson Y, Shah SM, Sophie R, Mir TE, Scholl HP (2015) Is There Excess Oxidative Stress and Damage in Eyes of Patients with Retinitis Pigmentosa?. **Antioxidants & Redox Signaling** 23:643-648.

Campos FM, Ribeiro SMR, Lucia CMD, Pinheiro-Sant AHM, (2009) Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. **Quimica Nova** 32:87-91.

Carnovali M, Luzi L, Banfi G, Mariotti M (2016) Chronic hyperglycemia affects bone metabolism in adult zebrafish scale model. **Endocrine** 54:808-817.

Castro JCG, Gutiérrez FR, Acuña CA, Cerdeira LAG, Tapullima AP, Cobos MR, Imán SAC (2013) Variación del contenido de vitamina C y antocianinas en *Myrciaria dubia* "camu-camu" **Revista de la Sociedad Química del Perú** 79:319-330.

Cerf ME (2013) Beta cell dysfunction and insulin resistance. **Frontiers Endocrinology (Lausanne)** 4:37.

Chen Y, Mehta G, Vasiliou V (2009) Antioxidant Defenses in the Ocular Surface. **The Ocular Surface** 7:176-185.

Chhablani J, Sharma A, Goud A, Peguda HK, Rao HL, Begun VU, Barteseneli G (2015) Neurodegeneration in type 2 diabetes: Evidence from spectral-domain optical coherence tomography. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 56:6333-6338.

Chhetri J, Jacobson G, Gueven N (2014) Zebrafish-on the move towards ophthalmological research. **Eye** 28:367-380.

Connaughton VP, Baker C, Fonde L, Gerardi E, Slack C (2016) Alternate immersion in an external glucose solution differentially affects blood sugar values in older versus younger zebrafish adults. **Zebrafish** 13: 87-94.

Cueva-Quiroz VA, Yunis-Aguinaga J, Ramos-Espinoza F, Claudiano GS, Marinho-Neto FA, Abreu SA, Moraes FR, Moraes JRE (2017). Protocolo para indução de diabetes com aloxana em pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: **XII Reunião Científica do Instituto de Pesca, São Paulo**. Anais da XII Reunião Científica do Instituto de Pesca.

De Araújo FFA, Martins BD, Borba CSMMA (2016). Oxidative Stress and Disease. **A master regulator of oxidative stress. The Transcription Nr. f2.10**: 185-199.

Dorseman AC, Soulé S, Weger M, Bourdon E, d'Hellencourt CL, Meilhac O, Diotel N (2017) Impaired constitutive and regenerative neurogenesis in adult hyperglycemic zebrafish. **The Journal of Comparative Neurology** 525:442-458.

Ferguson HW (2006) **Systemic Pathology of Fish A Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and their Responses in Disease**. London: Scotianpress p.245-265.

Fraser B, DuVal MG, Wang H, Allison WT (2013) Regeneration of Cone Photoreceptors when Cell Ablation Is Primarily Restricted to a Particular Cone Subtype. **PLoS ONE** 8:1-17.

Garcia F, Pilarski F, Onaka EM, Moraes FR, Martins ML (2007) Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture** 271:39-46.

Gemberling M, Bailey TJ, Hyde DR, Poss KD (2013) The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. **Trends in Genetic** 29:611-620.

Ghadiri Soufi F, Arbabi-Aval E, Kanavi RM, Ahmadi H (2015) Anti-inflammatory properties of resveratrol in the retinas of type 2 diabetic rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 42: 63-68.

Gibelalde A, Miguel MR, Mendicute J, Ayerdi S, Martínez-Zabalegi D (2010) Prevalencia de retinopatía diabética mediante cribado con retinógrafo no midriático. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra** 33:271-276.

Gleeson M, Connaughton V, Arneson, LS (2007) Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. **Acta Diabetologica** 44:157-163.

Goldblum D, Kontiola AI, Mittag T, Chen B, Danias J (2002) Non-invasive determination of intraocular pressure in the rat eye. Comparison of an electronic tonometer (TonoPen), and a rebound (impact probe) tonometer. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology** 240:942-946.

De Souza SGAE, Lellis-Santos C, Curi R, Lajolo FM, Genovese MI (2014) Frozen pulp extracts of camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh) attenuate the hyperlipidemia and lipid peroxidation of Type 1 diabetic rats. **Food Research International** 64:1-8.

Gupta SK, Kumar B, Nag TC, Agrawal SS, Agrawal R, Agrawal P, Saxena R, Srivastava S (2011) Curcumin prevents experimental diabetic retinopathy in rats

through its hypoglycemic, antioxidant, and anti-inflammatory mechanisms. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics** 27:123-130.

Gustavsen KA, Paul-Murphy JR, Weber IIES, Zwingenberger AL, Dunker FH, Dubielzig RR, Reilly CM, Murphy CJ (2018) Ocular anatomy of the black pacu (*Colossoma macropomum*): gross, histologic, and diagnostic imaging. **Veterinary Ophthalmology** 21: 507-515.

Halliwell B (1999) Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). **Free Radical Research** 31:261-272.

Hashiura T, Kimur E, Fujisawa S, Oikawa S, Nonaka S, Kurosaka D, Hitomi H (2017) Live imaging of primary ocular vasculature formation in zebrafish. **PLoS ONE** 12:1-17.

Heckler K, Kroll J (2017) Zebrafish as a model for the study of microvascular complications of diabetes and their mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences** 18:1-9.

Hermans N, Cos P, Maes L, Bruyne TD, Berghe DV, Vlietinck AJ, Pieters L (2007) Challenges and Pitfalls in Antioxidant Research. **Current Medicinal Chemistry** 14: 417-430.

Hernández C, Monte MD, Simó R, Casini G (2016) Neuroprotection as a Therapeutic Target for Diabetic Retinopathy. **Journal of Diabetes Research** 2016:1-18.

Herrera, D (2008) **Oftalmologia Clínica en Animales de Compañía**. Buenos Aires: Intermedica. p. 211-238.

Honorato CA, Nunes CDS, Carrilho ENVM, Moraes G (2013). Efeito do processamento de dietas com diferentes níveis de carboidratos e lipídeos sobre a composição corporal e perfil de ácidos graxos do filé do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Ciência Animal Brasileira** 14: 49-58.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2016. Pesquisa da Pecuária Municipal.

IDF, International Diabetes Federation (2019) <http://www.idf.org>

Intine RV, Olsen AS, Sarras MP (2013) A Zebrafish Model of Diabetes Mellitus and Metabolic Memory. **Journal of Visualized Experiments** 72:1-7.

Jegú M (2003) Serrasalminae (Pacus and piranhas). In: REIS RE, SOK, FERRARIS JUNIOR CJ, eds. Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS,182-196.

Jomori RK, Carneiro DJ, Martins GMIE, Portella MC (2005). Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, 243:175-183.

Jones TC, Hunt RD, King NW (2000) Retina. In: **Patologia Veterinária**. 6.ed. São Paulo: Manole, p.1334-1341.

Jörgens K, Stoll SJ, Pohl J, Fleming TH, Sticht C, Nawroth PP, Hammes, HP, Kroll J (2015) High tissue glucose alters intersomitic blood vessels in zebrafish via methylglyoxal targeting the VEGF receptor signaling cascade. **Diabetes** 64: 213-225.

Kalra S, Gupta Y (2015) Diagnosis of Diabetes. **Journal of Pakistan Medical Association** 65:336-337.

Karihtala P, Soini Y (2007) Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. **Apmis** 115:81-103.

Kontiola AI, Goldblum D, Mittag T, Danias J (2001) The induction/impact tonometer: A new instrument to measure intraocular pressure in the rat. **Experimental Eye Research** 73:781-785.

Kowluru RA, Zhong Q, Santos JM, Thandampallayam M, Putt D, Gierhart DL (2014) Beneficial effects of the nutritional supplements on the development of diabetic retinopathy. **Nutrition & Metabolism** 11: 2-11.

Kumar B, Gupta SK, Nag TC, Srivastava S, Saxena R, Jha KA, Srinivasan BP (2014) Retinal neuroprotective effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Experimental Eye Research** 125:193-202.

Lai AKW, Lo ACY (2013) Animal Models of Diabetic Retinopathy: Summary and Comparison. **Journal Diabetes Research** 2013:1-29.

Lenzen S (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia** 51:216-226.

Link BA, Collery RF (2015) Zebrafish Models of Retinal Disease. **Annual Review of Vision Science** 1:125-153.

Majumdar S, Srirangam R (2010) Potential of the Bioflavonoids in the Prevention/Treatment of Ocular Disorders. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 176: 951-965.

Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Estruch R, Corella D, Fitó M, Ros E (2015) Benefits of the Mediterranean Diet: Insights from the PREDIMED Study. **Progress in Cardiovascular Diseases** 58:50-60.

Mcmichael MA (2007) Timely Topics in Nutrition. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 231:714-720.

Metz CN, Hudson LK, Pavlov VA (2016) Rodents Models of Diabetes. **Principles of Diabetes Mellitus** 1-25.

Miyashita T, Koizumi R, Myoda T, Sagane Y, Niwa K, Watanabe T, Minami K (2018) Data on a single oral dose of camu-camu (*Myrciaria dubia*) pericarp extract on flow-mediated vasodilation and blood pressure in young adult humans. **Data in Brief** 16: 993-999.

Morris AC, Scholz TL, Brockerhoff SE, Fadool JM (2008) Genetic dissection reveals two separate pathways for rod and cone regeneration in the teleost retina. **Developmental Neurobiology** 68:605-619.

Murrell LR, Nace PF (1958) Experimental Diabetes in the Catfish: Normal and Alloxan-Diabetic Blood Glucose and Pancreatic Histology. **Endocrinology** 64:542-550.

Nascimento OV, Boleti AP, Yuyama LKO, Lima ES (2013). **Anais da Academia Brasileira de Ciencias** 85:355-363.

Neves LC, da Silva VX, Pontis JA, Flach A, Roberto SR (2015) Bioactive compounds and antioxidant activity in pre-harvest camu-camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh] fruits. **Scientia Horticulturae** 186:223-229.

Niaz K, Maqbool F, Khan F, Hassan FI, Momtaz S, Abdollahi M (2018) Comparative occurrence of diabetes in canine, feline, and few wild animals and their association with pancreatic diseases and ketoacidosis with therapeutic approach. **Veterinary World** 11:410-422.

Olsen AS, Sarras MP, Intine RV (2010) Limb Regeneration is Impaired in an Adult Zebrafish Model of Diabetes Mellitus. **Wound Repair and Regeneration** 18:532-542.

Opara EC (2006) Oxidative Stress. **Disease-a-Month** 52:183-198.

Pearsall EA, et al. (2019) Neuroprotective effects of PPAR $\alpha$  in retinopathy of type 1 diabetes. **PLoS ONE** 14:1-17.

Pellón M, Rojas M, Yaikin P, Del Sol M (2015). Estudio Morfológico de la Retina de Salmones (*Salmo salar*). **International Journal of Morphology** 33:788-793.

Reiter CEN, Sandirasegarane L, Wolpert EB, Klinger M, Simpson IA, Barber AJ, Antonetti DA, Kester M, Gardner TW (2003) Characterization of insulin signaling in rat retina in vivo and ex vivo. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism** 285:4 48-4.

Simo R, Carrasco E, García-Ramírez M, Hernández C (2006) Angiogenic and Antiangiogenic Factors in Proliferative Diabetic Retinopathy. **Current Diabetes Reviews** 2:71-98.



Sivron TA, Cohen A, Hirschberg DL, Jeserich G, Schwartz M (1991) Soluble factor(s) produced in injured fish optic nerve regulate the postinjury number of oligodendrocytes: Possible role of macrophages. **Glia** 4:591-601.

Slatter D (2009) **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**, 4<sup>a</sup> ed. Saunders, Philadelphia EUA p. 21-25.

Sohn EH, et al. (2016) Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 113: E2655-E2664.

Stem MS, Gardner TW (2013) Neurodegeneration in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. **Current Medicinal Chemistry** 20: 3241-3250.

Suganya N, Bhakkiyalakshmi E, Sarada DVL, Ramkumar KM (2016) Reversibility of endothelial dysfunction in diabetes: Role of polyphenols. **British Journal of Nutrition** 116:223-246.

Szkudelski T (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research** 50: 536-546.

Tovar MO, Obando MJ, Gómez E, Caldas ML, Hurtado H (2009) Histología y morfometría del ojo del pez dulceacuícola *Paracheirodon axelrodi* (Characiformes: Characidae). **Revista de Biología Tropical** 57:1107-1118.

Ueda H, Kuroiwa E, Tachibana Y, Kawanishi K, Ayala F, Moriyasu M, (2004) Aldose reductase inhibitors from the leaves of *Myrciaria dubia* (H. B. & K.) McVaugh. **Phytomedicine** 11:652-656.

Viswanath K, Imcgavin DDM (2003) Diabetic Retinopathy: Clinical Findings and Management. **Community Eye Health** 16:21-24.

Wan J, Goldman D (2016) Retina regeneration in zebrafish. **Current Opinion in Genetics & Development** 40: 41-47.

Wang Y, Chen S, Yu O (2011) Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology** 91:949-956.

Wang W, Hernandez J, Moore C, Jackson J, Narfström K (2016) Antioxidant supplementation increases retinal responses and decreases refractive error changes in dogs. **Journal of Nutritional Science** 5:1-7.

West IC (2000) Radicals and oxidative stress in diabetes. **Diabetic Medicine** 17:171-180.

WHO, Global Report on Diabetes (2016).

Willcox JK, Ash SL, Catignani GL (2004) Antioxidants and prevention of chronic disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 44:275-295.

Yunis-Aguinaga J, Claudiano GS, Marcusso PF, Manrique WG, Engrácia MJR, Moraes FR, Fernandes JBK (2015) *Uncaria tomentosa* increases growth and immune activity in *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus agalactiae*. **Fish and Shellfish Immunology** 47: 630-638.

Yunis-Aguinaga J, Fernandes DC, Eto SF, Claudiano GS, Marcusso PF, Marinho-Neto FA, Fernandes JBK, Moraes FR, Engrácia MJR (2016) Dietary camu-camu, *Myrciaria dubia*, enhances immunological response in Nile tilapia. **Fish and Shellfish Immunology** 58:284-291.

Zeng K, Yang N, Wang D, Li S, Ming J, Wang J, Yu X, Song Y, Zhou X, Yang Y (2016) Resveratrol Prevents Retinal Dysfunction by Regulating Glutamate Transporters, Glutamine Synthetase Expression and Activity in Diabetic Retina. **Neurochemical Research** 41:1050-1064.

Zouache MA, Eames I, Samsudin A, (2016) Allometry and scaling of the intraocular pressure and aqueous humour flow rate in vertebrate eyes. **PLoS ONE** 11:1-25.

## **CAPÍTULO 2 - Caracterização mediante uso da retinografia, avaliação macroscópica e histomorfométrica da retina do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**

Karina Eliana Herencia Bueno<sup>1</sup>, Rachel L.A.L.T, Neto<sup>2</sup>, Ivan Ricardo Martinez Padua<sup>1</sup>, Alexandre Augusto Franchi de Barros Sobrinho<sup>1</sup>, José Luiz Laus<sup>1</sup> Fabricio Singaretti de Oliveira<sup>2</sup>, Julieta Engrácia Rodini de Moraes<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ophthalmology Unit, Department of Small Animal Medicine and Surgery, Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences, FCAV Unesp Jaboticabal, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Auburn University, Auburn, AL, USA

<sup>3</sup>Department of Animal Morphology and Physiology, FCAV Unesp Jaboticabal, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Ictiopatologia Laboratory, Department of Veterinary Pathology, FCAV Unesp Jaboticabal, SP, Brazil.

Corresponding author Karina Eliana Herencia Bueno Ophthalmology Unit, Department of Small Animal Medicine and Surgery, Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences, FCAV Unesp, Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil.

E-mail address: eliana.herencia@unesp.br

## Resumo

**Objetivo:** O objetivo desta pesquisa foi o de caracterizar a retina do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) mediante o uso de retinógrafo, macroscopia e histomorfometria

**Procedimento:** Quinze peixes pacus foram utilizados para a avaliação das características específicas da retina.

**Resultados:** O fundo do olho é predominantemente tapetal observando-se também uma região não tapetal. A retina é de padrão holangiótico com vasos epiretinais dicotomizados e ramificados a partir de um vaso maior acompanhando ao processo falciforme e a periférica de dois nervos ópticos. A espécie apresenta oito camadas da retina com um importante epitélio pigmentado em toda a sua extensão, sendo predominantes nos fotorreceptores os cones.

**Conclusão:** O pacu apresenta retina holangiótica com presença de dois nervos ópticos e um epitélio pigmentado com maior número de cones apresentando características similares a outros teleósteos tornando-se importante modelo para estudos de neurogênese retinal e fármacos com ação neuroprotetora.

**Palavras-chave:** fotorreceptores, fundo ocular, nervo óptico, olho, teleósteo.

## 1. INTRODUÇÃO

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie de porte médio, própria da América do Sul [1], teleósteo que pertence à família *Characidae*. É essencialmente de água doce, de hábito alimentar onívoro, [2] que lhe permite lidar em condições de restrições. Há mais de uma década é considerado como uma das espécies de maior relevância na aquicultura do Brasil [3]. É um importante modelo para o estudo da imunologia, medicina regenerativa, ontogenia e fisiologia de peixes [4].

A retina é uma estrutura bem conservada nos vertebrados que compartilham características fisiológicas e anatômicas similares [5]. A estrutura da retina nos teleósteos, comparativamente aos mamíferos, apresenta interessante variabilidade entre família ou gênero dos seus fotorreceptores especializados, (bastonetes, cones simples, duplos, triplos ou de padrão hexagonal), [6] que é influenciada pelo tipo de habitat e requerimentos de visão [7]. No pacu, há estudos de ontogenia e morfologia do sistema sensorial [8], o qual apresenta desenvolvimento rápido, comparativamente a outros sistemas. Durante o estado larvário, o desenvolvimento das estruturas internas dos olhos, especificamente a retina, é completado 10 dias após a eclosão [9]. No entanto, na literatura não existe informação das suas características macroscópicas e detalhes histológicos da retina nessa espécie.

O objetivo deste trabalho foi descrever as características do fundo ocular, a morfometria e aspectos histológicos da retina do pacu.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - proc. Nº 018718/17) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal-SP. Os preceitos éticos e as diretrizes da “Association for Research in Vision and Ophthalmology - ARVO (National Institutes of Health Publications No 85-23: Revised 1985)” para

utilização de olhos de animais e ensino ou em pesquisa, foram obedecidos. Foram utilizados 12 peixes pacu com peso médio de  $213,87 \pm 8,26$  g de  $21,19 \pm 0,26$  cm. Os espécimes foram adquiridos junto ao criadouro comercial e mantidos sob condições padronizadas com alternância de claro/escuro (14/10 horas), por duas semanas, previamente ao início da pesquisa. A qualidade da água permaneceu no nível de conforto dos peixes (O:  $4,2 \pm 0,36$  mg/L; pH:  $6,88 \pm 0,1$ ; T°:  $27,32 \pm 0,17^\circ\text{C}$ ), nos valores aceitáveis para a espécie [10]. Foram utilizados 24 olhos de peixes pacus saudáveis sem alteração ocular e alimentados com ração comercial.

Os indivíduos foram anestesiados por imersão em benzocaína (100 mg/L), até cessarem seus movimentos na água e foram submetidos à avaliação do fundo de ambos os olhos com equipamento para documentação digital (Topcon TCR-50DX, Tokyo, Japan) (Figura 1.A) e com o auxílio de uma lente manual de 20 dioptrias (Dioptrix, Toulouse, França), para melhor focalização (Figura 1.B). Posteriormente, os animais foram submetidos à eutanásia após hemidissecção do encéfalo [11] e os olhos foram enucleados. A inspeção macroscópica do bulbo ocular, bem como a divulsão e disseção do nervo óptico e esclerectomia foram realizadas com auxílio de microscópio cirúrgico. Foram realizadas as medições: antero posterior, dorsoventral, lateromedial, com o auxílio de um paquímetro (Viennet, King Tools, Brasil), antes da fixação. O diâmetro antero posterior foi utilizado para calcular o diâmetro relativo do olho  $\text{DAO} = (\text{diâmetro antero posterior do olho} / \text{longitude total do peixe} * 100)$  [12]. Para a observação macroscópica da retina foi retirado o botão corneal e descreveram-se suas características mediante registro fotográfico. As amostras foram fixadas em formaldeído 10% tamponado (10% neutral buffered formalin, Thermo electron corporation, Cheshire, UK) por 48 horas [13] até o momento da inclusão em parafina histológica. O material foi submetido a cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$  e corados por hematoxilina de Harrys e Eosina de Lyson (LabSynth, Diadema, SP, Brasil). Os cortes foram realizados em forma transversal até atingir o nervo óptico. Para a morfometria, com o auxílio de um programa de análise de imagens StenCells (Stencells v.1.5 Tokyo, Japan) em microscópio óptico convencional, equipado com uma câmera digital, seis imagens (campos), foram obtidas de cada lâmina (objetiva 40x), contemplando-se toda a extensão da retina, incluindo-se a cabeça do nervo óptico, em sua porção central. Em cada campo realizaram-se cinco avaliações, equidistantes,

da espessura total da retina, bem como das espessuras de cada uma de suas camadas. Obtiveram-se a média e erro padrão.

### **3. RESULTADOS**

Imagens representativas da realização da retinografia (Figura 1), fundo ocular (Figura 2), macroscopia da inserção do nervo e fundo ocular (Figura 3), comparação do fundo ocular à retinografia e macroscopia (Figura 4), nervos ópticos (Figura 5), inserção dos nervos ópticos (Figura 6), recorrido dos nervos ópticos (Figura 7-8), olho do pacu (Figura 9), corte transversal da retina (Figura 10), espessura da retina (Figura 11), nervos ópticos (Figura 12) e segmentos do nervo óptico (Figura 13) são apresentados.

#### **3.1. Retinografia**

O fundo do olho do pacu é predominantemente tapetal dourado. Zonas de leve pigmentação na região dorsal evidenciaram-se com dificuldade. O nervo óptico é alongado sem pigmentação que recorre em paralelo a um pequeno processo falciforme. A retina é de padrão vascular do tipo holangiótico devido à importante vasculatura dicotômica epiretinal em formato de Y. Um vaso principal de importante calibre recorre em paralelo o processo falciforme, o qual origina outros grandes vasos perpendiculares que ramificam. Cada olho apresenta entre 10-12 vasos maiores e 20-22 vasos menores que continuam se dividindo em direção à periferia. (Figura 2).



Figura 1. Imagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) demonstrando contenção manual para a realização do exame de retinografia. Em A: observe-se o posicionamento horizontal para o olho estar totalmente iluminado e favorecer a imagem da retina na sua total extensão. Em B: note-se o posicionamento do peixe junto à lente de 20 dioptrias para o registro das imagens. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.

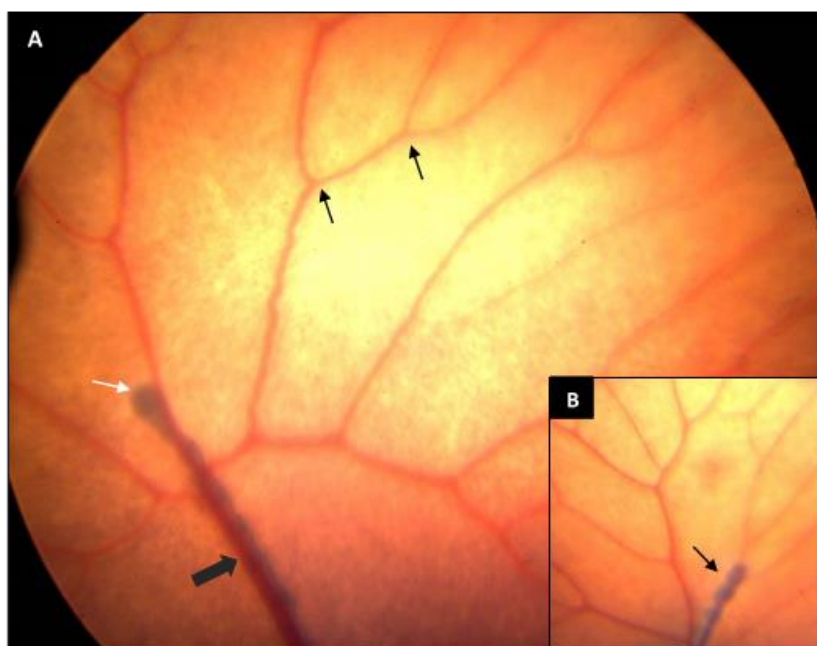


Figura 2. Imagem representativa do fundo do olho e nervo óptico do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). A: Observa-se a vasculatura dicotomizada da região de retina central (setas finas), o vaso maior calibre (seta maior) e o processo falciforme (seta branca). Em B: apresenta-se em detalhe uma parte da retina central com seu processo falciforme (seta). Laboratório de Oftalmologia Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.



### 3.2. Observação macroscópica

Na inspeção macroscópica o nervo é centralizado e ao retirar-se o botão corneal, observa-se o detalhe de ambos os tapetes e suas estruturas (Figura 3). A região tapetal é predominante, e apenas uma porção não tapetal (aproximadamente  $\frac{1}{4}$  da área total) na região ventral está presente. O processo falciforme aparece na região ventral à direção ao centro junto ao nervo óptico que é de aspecto alongado e pálido, desde onde a vasculatura de maior calibre começa a se ramificar (Figura 4).

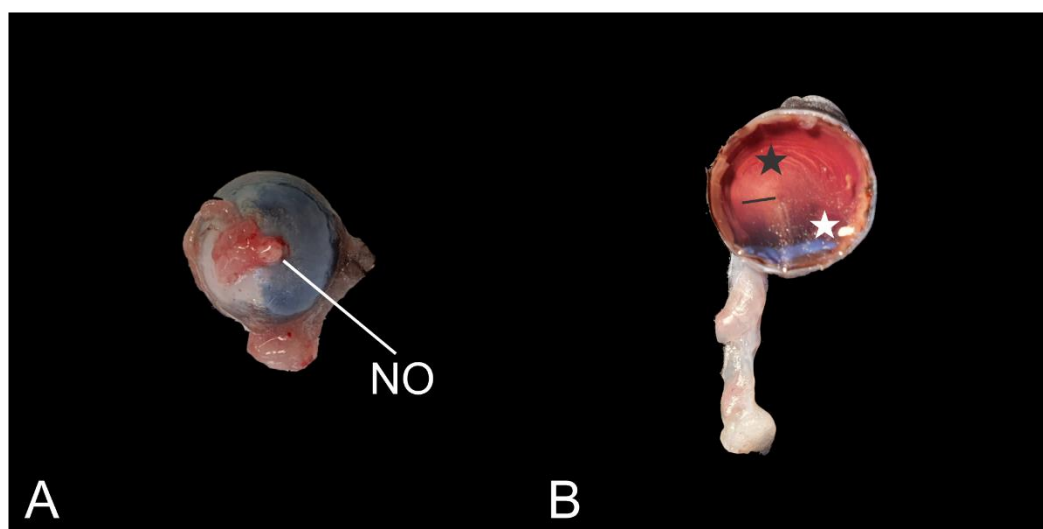


Figura 3. Imagem macroscópica representativa do olho do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Em A: Vista posterior, note-se o posicionamento centralizado do nervo óptico (NO). Em B: retina completa após retirar o botão corneal, observa-se o detalhe da região tapetal (estrela preta), não tapetal (estrela branca) e processo falciforme (linha preta). Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.

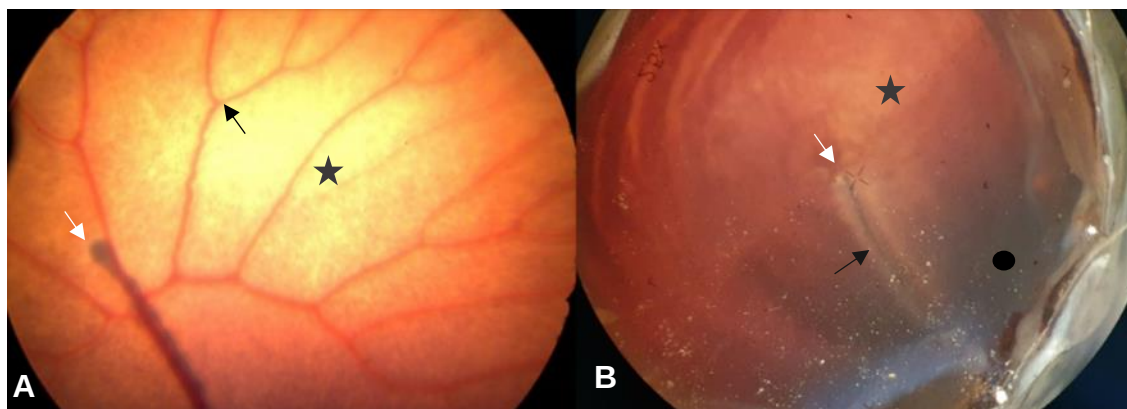


Figura 4. Imagem comparativa do fundo do olho do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Em A: Imagem registrada mediante o retinógrafo, observa-se ao detalhe de uma predominante região tapetal (estrela preta), a vasculatura dicotomizada (seta preta) e o processo falciforme (seta branca) na região ventral. Em B; imagem macroscópica após enucleação (sem o botão corneal) observa-se a região tapetal (estrela preta), não tapetal (círculo), o processo falciforme (seta branca) e o nervo óptico alongado paralelo ao processo falciforme de cor cinza (seta preta). Laboratório de Oftalmologia Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, FCAV-Unesp, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.

Durante a realização da divulsão dos nervos ópticos e a esclerectomia, foi possível ter maiores detalhes. O nervo óptico no pacu caracteriza-se por ser alongado e formado por dois ramos nervosos diferenciados (Figura 5), que são inseridos na retina embaixo da esclera (Figura 6). O ramo menor encontra-se inserido na região da fóvea-temporal e o tramo maior continua a sua extensão até a margem da região mais ventral, atrás da região não tapetal (Figura 7-8).



Figura.5. Imagem representativa dos dois nervos ópticos divulsionados (seta branca e preta). Laboratório de Oftalmologia Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, FCAV-Unesp, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.

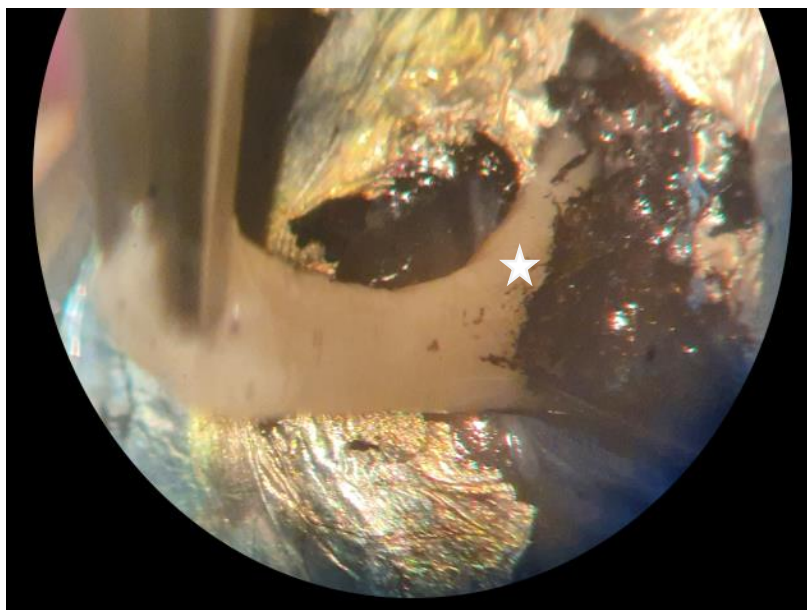


Figura 6. Imagem representativa da inserção de ambos os ramos nervos (estrela branca). Laboratório de Oftalmologia Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, FCAV-Unesp, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.



Figura 7. Imagem representativa do olho do pacu. Estruturas visíveis inclui a córnea (C), lente (L), vítreo (V), retina (R), coroides (CR), interior da gordura da coróide (estrela branca), esclera (SC), junção dos dois nervos (NJ), trajeto do nervo maior em direção ventral (ON). Laboratório de Oftalmologia Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, FCAV-Unesp, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.



Figura 8. Olho divulsionado. Observa-se o recorrido do nervo óptico em direção ventral (seta branca). Laboratório de Oftalmologia Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, FCAV-Unesp, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.

### 3.3 Aspectos histológicos

O olho apresenta diâmetro antero posterior =  $1,00 \pm 0,022$  cm, diâmetro dorsoventral =  $1,101 \pm 0,023$  cm, e diâmetro láteo-medial =  $1,21 \pm 0,031$  cm. O formato do olho do pacu é arredondado e o diâmetro antero posterior é similar ao dorsoventral (Figura 9).

A retina do pacu é conformada pelo epitélio pigmentar e pela neuroretina, a qual compreende oito camadas e duas membranas (Figura 10). O epitélio pigmentar compõe-se de um epitélio simples cuboidal e grânulos de melanina que possuem contato direto com os segmentos externos dos fotorreceptores. Na neuroretina, evidenciam-se: 8 camadas:

- a camada dos fotorreceptores, com predomínio de cones de diversos formatos;
- a membrana limitante externa, que divide a camada dos fotorreceptores;
- a camada nuclear externa, formada por 7 camadas é composta pelos núcleos dos bastonetes e cones;
- a camada plexiforme externa, composta pelas prolongações dos axônios dos fotorreceptores;
- a camada nuclear interna apresenta de 4-6 camadas é composta pelos núcleos das células horizontais, bipolares e amácrinas;
- a camada plexiforme interna formada pelas prolongações da camada anterior;
- a camada das células ganglionares formada pelos núcleos de tamanhos diversos entre pequenos e grandes de difícil diferenciação com as gliais;
- a camada das prolongações dos axônios das células ganglionares;
- a membrana limitante interna que tem contato direto com o vítreo, formada por fibras ao longo da retina.



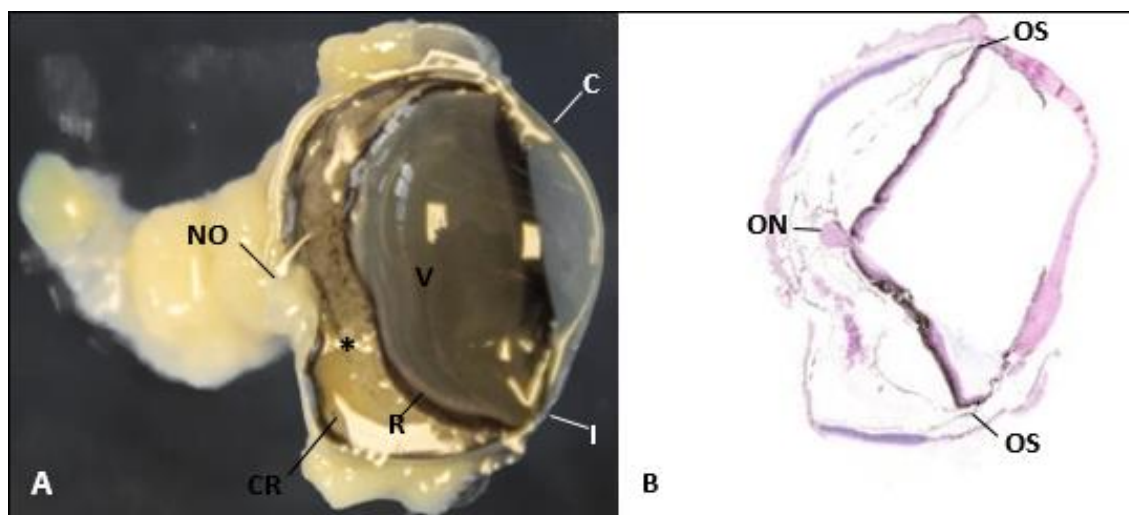


Figura 9. Anatomia macroscópica e histológica do olho do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Em A, corte parasagital de um dos olhos fixados em formaldeído sendo visíveis: córnea (c), a íris (i), o vítreo (v), a retina (R), a rete mirabile coróide (CR), com abundante gordura (\*), o nervo óptico (NO). Em B: corte histológico parasagital (coloração de hematoxilina e eosina, 40X) em toda sua extensão de ora serrata a ora serrata (OS) e o nervo óptico (NO). Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.

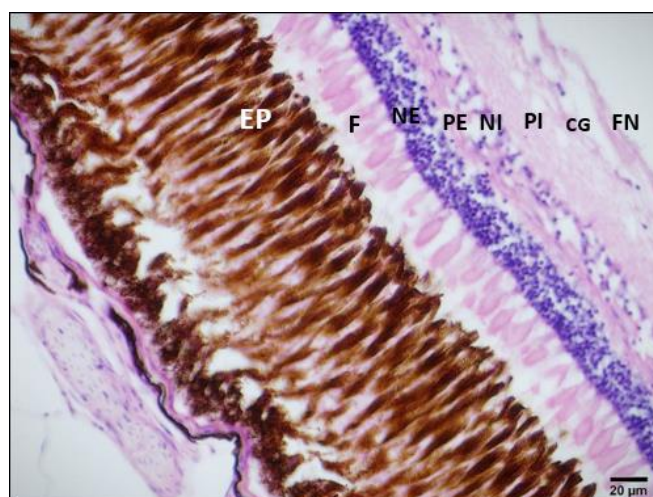


Figura 10. Corte transversal da retina do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (coloração de hematoxilina e eosina, 20X). Observa-se o EP: epitélio pigmentar; F: fotorreceptores; NE: camada nuclear externa; PE: camada plexiforme externa; NI: camada nuclear interna; PI: camada plexiforme interna, CG: células ganglionares; FN: Fibras nervosas (coloração de hematoxilina e eosina, 20x). Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.

A espessura da retina totaliza =  $221,55 \pm 3,68 \mu\text{m}$ , a retina posterior =  $284,65 \pm 23,91 \mu\text{m}$  e a retina anterior =  $80,19 \pm 7,86 \mu\text{m}$ . As medições da espessura das camadas encontram-se na tabela 1 (Figura 11).

Tabela 1. Médias e erro padrão da espessura da retina e suas camadas ( $p < 0,05$ ).

| Camada da retina          | Média ( $\mu\text{m}$ ) | EP   | Intervalo ( $\mu\text{m}$ ) |
|---------------------------|-------------------------|------|-----------------------------|
| Espessura retina total    | 221,55                  | 3,68 | 210 – 232,98                |
| Camada epitélio pigmentar | 88,45                   | 3,34 | 75,7 – 99,86                |
| Camada de Fotorreceptores | 110,71                  | 5,66 | 96,5 – 134,07               |
| Camada nuclear externa    | 21,95                   | 0,41 | 20,7 – 23,17                |
| Camada plexiforme externa | 7,92                    | 0,61 | 6,21– 10,08                 |
| Camada nuclear interna    | 12,40                   | 1,44 | 7,81 – 15,09                |
| Camada plexiforme interna | 34,56                   | 0,54 | 31,14 – 34,56               |

\*Dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (EP).

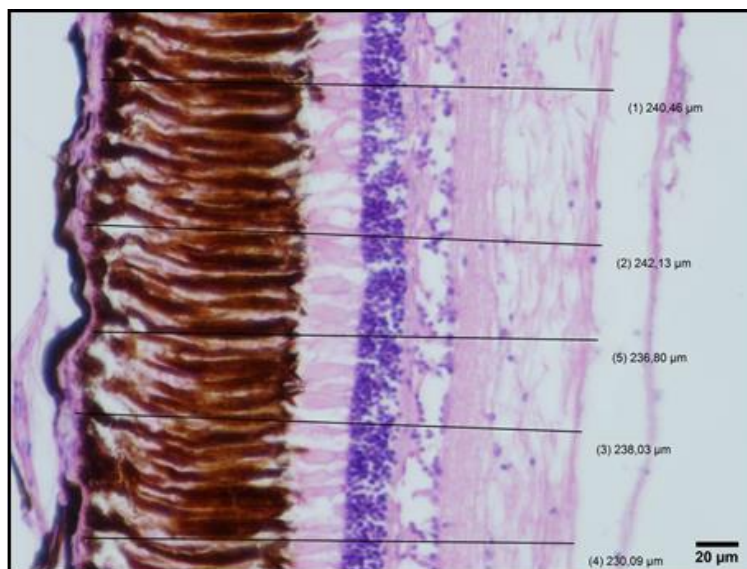


Figura 11. Espessura total da retina do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (coloração de hematoxilina e eosina, 20X). Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.

Em dois pacus, encontramos uma provável evidência da presença dos segmentos do nervo óptico separados um menor e um maior (Figura 12 e Figura 13).

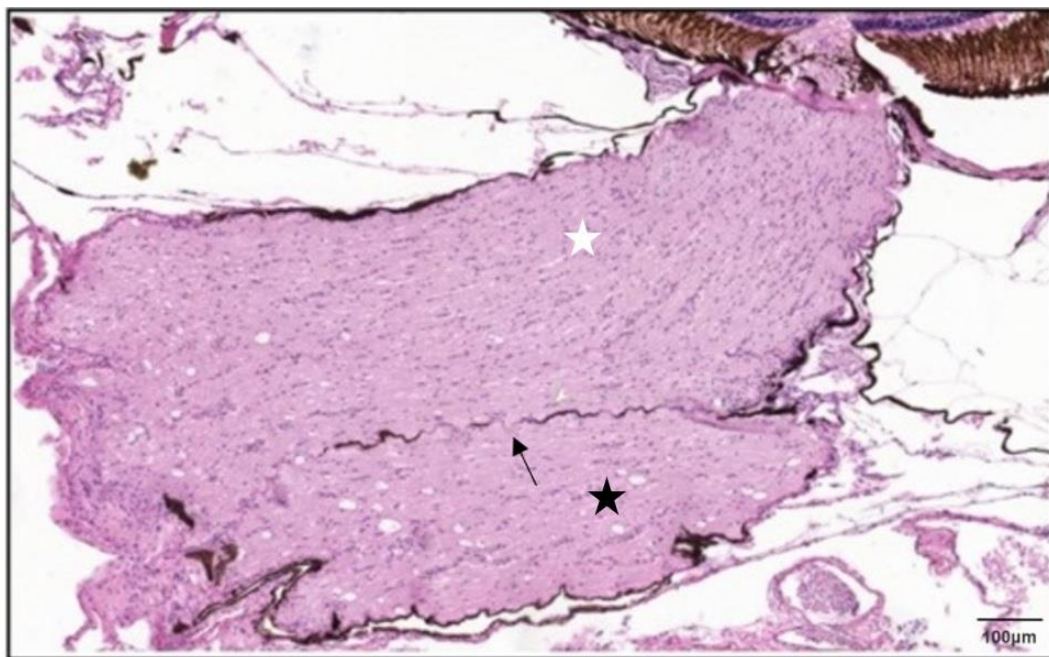


Figura 12. Nervos ópticos do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Observa-se a junção dos dois nervos ópticos (seta preta), mais curto (estrela branca) e mais longo (estrela preta). Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.

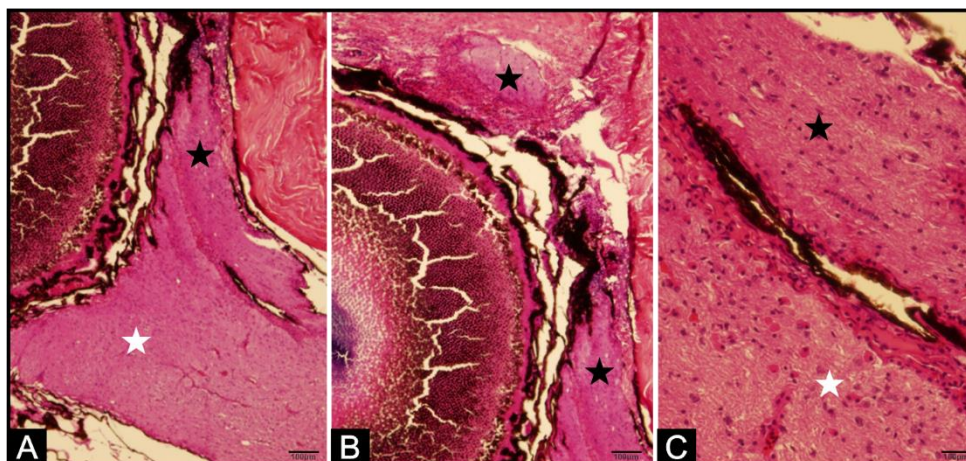


Figura 13. Segmentos do nervo óptico do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). A: Note-se os dois segmentos um nervo menor (estrela branca) e um nervo maior (estrela preta) B: trajeto do nervo maior (estrela preta). C: Detalhe da separação dos segmentos nervo menor (estrela branca) e nervo maior (estrela preta) (40X). Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.



O processo falciforme não foi identificado em todos os cortes devido à variação em angulação e profundidade entre as amostras parafinadas. Nos indivíduos onde foi detectado, o processo falciforme encontrou-se entre a superfície posterior da íris e a *pars plana* do corpo ciliar, e consistiu em uma protuberância cônica ou filiforme de tecido fibrovascular frouxo com vasos delicados envolto por uma camada de epitélio densamente pigmentado, e contendo feixes do músculo retrator da lente em sua porção anterior (Figura 14).

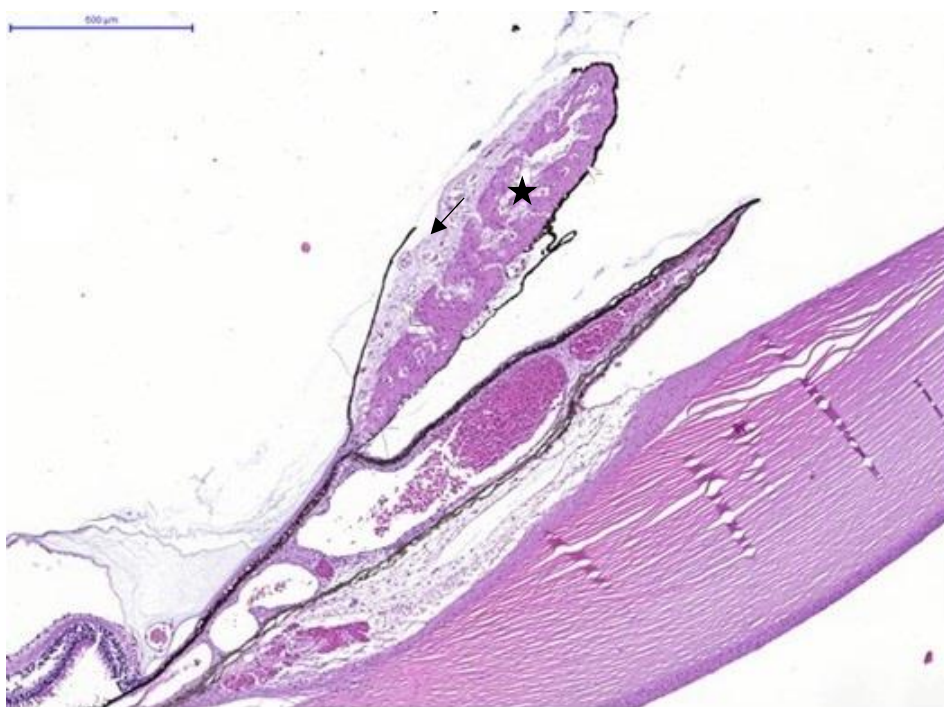


Figura 14. Processo falciforme do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Note-se a presença do músculo retrator (estrela) junto ao processo falciforme (seta). Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.

#### 4. DISCUSSÃO

A avaliação do fundo do olho do pacu mediante a retinografia evidenciou a região tapetal dourada como descrito anteriormente no Tambaqui (*Colossoma macropomum*) [13]. O reflexo tapetal dourado foi descrito na família dos

Characiformes, no peixe gato ou também conhecido como cascudo (Siluriforme), e isso ocorre pela presença da tirosina no epitélio pigmentar da retina [14]. O nervo óptico alongado foi de difícil identificação, provavelmente pela luz do aparelho de retinografia. Por isso, foi necessária a avaliação macroscópica da retina após enucleação para determinar que o pacu apresenta fundo tapetal predominante, e uma pequena porção não tapetal na região ventral, e observar o nervo óptico como estrutura alongada e esbranquiçada que acompanha um fino processo falciforme, como descrito em avaliações histológicas [13]. Ainda, a vascularização epiretinal descrita por toda a extensão da retina é característica na família Characidae e na literatura, são escassos os trabalhos que reportam imagens completas do fundo ocular com todas as suas estruturas em peixes [13] ou golfinhos [15], de relevância para estudos clínicos de retina.

O pacu, espécie onívora e diurna, tem um DAP (diâmetro antero posterior do olho) de 4,72% semelhante aos valores de 4% em espécies diurnas (*Oncorhynchus mykiss*) [16], *Barbus tauricus* [17], *Pimephales promelas* [18]. Essa medição é relacionada com o tipo alimentar da espécie. Existe tendência nas espécies noturnas e de hábitos carnívoros, terem olho de maior tamanho permitindo maior sensibilidade visual.

A retina do pacu caracteriza-se por uma grande camada de epitélio pigmentar que abarca 40% da área retiniana total, próximo ao observado em sardinelas, quase um terço da espessura total [6], visando-se proteção dos segmentos externos dos fotorreceptores e preservação dos fotopigmentos. O íntimo contato com os fotorreceptores estaria relacionado a um processo ativo de fagocitose [19] e proporcionaria estabilidade arquitetônica [20].

A retina do pacu é dupla, composta por bastonetes e cones com predominância destes últimos (simples e duplos), o que também é em outras espécies de teleósteos como os peixes cardinais [21]. O comprimento da camada dos fotorreceptores variou, dependendo da localização da retina; sendo que na região posterior foi de  $315,24 \pm 154,43 \mu\text{m}$  e na região anterior de  $36,93 \pm 3,61 \mu\text{m}$ . Observou-se maior quantidade dos fotorreceptores na região posterior [6], com a presença de material eosinofílico epiretinal, sem características de inflamação, como já reportado no pacu preto [13].

Na tentativa de identificar os dois feixes dos nervos ópticos à histologia, os cortes não foram totalmente claros. Tal fato se deve provavelmente devido à ramificação ou inserção se encontrarem em planos de corte diferentes ou oblíquos, não inclusos na técnica de corte parasagital, padronizada para este estudo. Porém, nossos achados à macroscopia são similares como nos peixes noturnos descrito anteriormente (Collin et al., 2005), onde os dois feixes são facilmente identificáveis. Na avaliação histológica foram observados infiltrados linfoplasmocíticos, presentes na úvea anterior, coróide e vasos epiretinais, sem outras características histológicas como parte de resposta inflamatória. Assim como também, células granulares eosinófilas foram observadas no nervo óptico como já foi reportado no black pacu [13].

## **5. CONCLUSÃO**

O pacu apresenta retina holangiótica com presença de dois nervos ópticos e epitélio pigmentário importante, predominantes cones, apresentando características similares aos outros teleósteos, tornando-se importante modelo para estudos de neurogênese retinal e fármacos com ação neuroprotetora.

## **CONFLITO DE INTERESSES**

Nós declaramos que não há conflito de interesses.

## 6. REFERÊNCIAS

- [1] IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2016. Pesquisa da Pecuária Municipal.
- [2] Bicudo AJA, Sado RY, Cyrino JEP. "Growth, body composition and hematology of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed increasing levels of ractopamine Arq. Bras. Med. Vet. Zootec 2012; 64(5): 1335-1342.
- [3] Belo MAA, Schalch SHC, Moraes FR, Soares VE, Otoboni AMMB, Moraes JER. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. *J. Comp. Pathol* 2005; **133**:146-154.
- [4] Shibata E, Ando K, Murase E, Kawakami A. Heterogeneous fates and dynamic rearrangement of regenerative epidermis-derived cells during Zebrafish fin regeneration *Development* 2018; **145**(8): 162016.
- [5] Malicki J, Pooranachandran N, Nikolaev A, Fang X, Avanesov A. Analysis of the retina in the zebrafish model. *Methods Cell Bio* 2016; **134**:257-334.
- [6] Salem MA. Structure and function of the retinal pigment epithelium, photoreceptors and cornea in the eye of *Sardinella aurita* (Clupeidae, Teleostei). *J. Basic Appl. Zool* 2016; **75**: 1-12.
- [7] Tovar MO, Obando MJ, Gómez E, Caldas ML, Hurtado H. Histología y morfometría del ojo del pez dulceacuícola paracheirodon axelrodi (characiformes: Characidae). *Rev. Biol. Trop* 2009; **57**(4):1107-1118.
- [8] Portella DJCMC, Jomori RK, Leitão NJ, Menossi OCC, Freitas TM, Kojima JT, Lopes TS, Clavijo-Ayala JA. Larval development of indigenous South American freshwater fish species, with particular reference to pacu (*Piaractus mesopotamicus*). A review. *Aquaculture* 2014; **432**: 402-417.
- [9] Clavijo-Ayala JA. Ontogenia do sistema sensorial de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Characidae: Serrasalminidae) *TESE* 2008; 53.
- [10] Urbinati EC, Gonçalves FD. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Baldisseroto B, Gomes LC. (Eds.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: UFSM, 2005; 225-246.
- [11] Gleeson M, Connaughton V, Arneson LS. Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. *Acta Diabetol* 2007; **44**(3): 157-163.
- [12] Schmitz L, Wainwright PC. Nocturnality constrains morphological and functional diversity in the eyes of reef fishes. *BMC Evol Biol* 2011; **11**:338.
- [13] Gustavsen KA *et al.* Ocular anatomy of the black pacu (*Colossoma macropomum*): gross, histologic, and diagnostic imaging. *Vet. Ophthalmol* 2018;

**21(5): 507-515.**

- [14] Ito S, Thurston EL, Nicol JAC. Melanoid tapeta lucida in teleost fishes. *Proc. R. Soc. London - Biol. Sci* 1975; **191**(1104): 369-385.
- [15] Ninomiya H. Microvasculature of the California sea lion (*Zalophus californianus*) eye and its functional significance. *Vet. Ophthalmol* 2007; **20**(3):205-213.
- [16] Tovar BMO, Contreras BLF, Caldas ML, Rodríguez CD, Hurtado GH. Histological And Morphometrical Comparison Between *Eremophilus mutisii* ( Trichomycteridae ) And *Oncorhynchus mykiss* (Salmonidae) eyes. *Acta Biol. Colomb* 2008; **13**(2): 73-88.
- [17] Verep B, Turan D, Kovac V. Preliminary results on morphometry of barbell (*Barbus tauricus*, Kessler, 1887) in the streams of Rize and Artvin providences (Turkey). *Turk. J. Fish. Aquat. Sci* 2006; **6**: 17-21.
- [18] Anseeuw D, Gaethofs T, Louette G. First record and morphometry of the non-indigenous fathead minnow *Pimephales promelas* (Rafinesque, 1820) (Teleostei, Cyprinidae) in Flanders (Belgium). *Belg. J. Zool* 2005; **135**: 87-90.
- [19] Young RW. Rhythmic shedding of rod and cone membranes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1978; **17**, 105-16.
- [20] Bennett MVL. Electric organs. In W.S. Hoar and D.J. Randall (eds): *Fish Physiology*. New York Academic Press 1971; 347-491.
- [21] Fishelson L, Ayalon G, Zverdling A, Holzman R. Comparative Morphology of the Eye (with Particular Attention to the Retina) in Various Species of Cardinal Fish (Apogonidae, Teleostei). *Anat. Rec. - Part A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol* 2004; **277**(2): 249-261.

### **CAPÍTULO 3 - Efeitos da suplementação do camu-camu (*Myrciaria dubia*) sobre a retina de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) aloxano diabéticos**

Karina Eliana Herencia Bueno<sup>a</sup>, Victor Alexander Cueva Quiroz<sup>c</sup>, Ivan Ricardo Martinez Padua<sup>a</sup>, Nicoli Mello, Rachel Neto<sup>c</sup>, Daniela Moura dos Santos<sup>a</sup>, Alexandre Augusto Franchi de Barros Sobrinho<sup>a</sup>, José Luiz Laus<sup>a</sup>, Fabricio Singaretti de Oliveira<sup>b</sup>, Julieta Engracia Rodini de Moraes<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Ophthalmology Unit, Department of Small Animal Medicine and Surgery, Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences, FCAV Unesp Jaboticabal, SP, Brazil.

<sup>b</sup>Morfology and physiology animal Department, FCAV Unesp Jaboticabal, SP, Brazil.

<sup>c</sup>Ictiopatology laboratory, Department of Pathology the Veterinary Medicine FCAV Unesp Jaboticabal, SP, Brazil.

Corresponding author Karina Eliana Herencia Bueno Basic science area, Ophthalmology Unit, Department of Small Animal Medicine and Surgery, Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences, FCAV Unesp, Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil.

E-mail address: eliana.herencia@unesp.br

**RESUMO** - Avaliou-se o efeito do camu-camu sobre células da retina mediante a eletrorretinografia, as avaliações clínicas segundo o escore do nível de retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) mediante a retinografia, morfometria, histopatologia, imunohistoquímica (IQ) usando anticorpos contra caspase-3 e caspase-9 e o índice apoptótico mediante o TUNEL. O estudo foi composto por peixes pacus (*Piaractus mesopotamicus*) machos e fêmeas, dispostos em 6 grupos (n=40). Os grupos ND0, ND500 e ND1000 foram constituídos por animais controles e os grupos D0, D500 e D1000 por peixes diabéticos sob indução por aloxana. Os grupos ND0 e D0 receberam ração comercial, os grupos ND500 e D500 ração enriquecida com 500mg/kg de camu-camu e os grupos ND1000 e D1000 ração enriquecida com 1000mg/kg de camu-camu. Os resultados à eletrorretinografia, demonstraram que o tempo implícito da onda b para os bastonetes foi significativamente menor no grupo D500 em comparação aos grupos ND0 e ND500. As razões de amplitude e tempo a/b e b/a revelaram alterações precoces na retina. A retinografia detectou lesões severas de RDNP no grupo D0 e com menor gravidade nos grupos D500 e D1000. O score de risco apresentou diferença estatística entre os grupos D1000 com os grupos ND0, ND500 e ND1000. No entanto, o score clínico manifestado com a suplementação de 500mg/kg revelou uma tendência de menor severidade de RD. A morfometria revelou que o grupo D0 teve uma diminuição significativa da espessura da retina total e posterior assim como da camada dos fotorreceptores quando comparado com o grupo ND0. Também o diabetes diminuiu significativamente a camada do epitélio pigmentar e dos fotorreceptores ao ser comparado com o ND500. Ademais, o grupo D1000 apresentou maior espessura do que os grupos D0 e o D500. Maiores alterações vasculares nos vasos epiretinais foram identificadas no grupo D0 quando comparados aos grupos D500 e D1000. Uma tendência de maior marcação no escore final para o índice apoptótico, caspase-3 e caspase-9 no grupo D0 e menor marcação em D500 e D1000. O camu-camu melhorou as alterações no ERG, retinografia, morfometria, histopatologia e índice apoptótico e IQ. Os resultados desta pesquisa indicam efeitos benéficos da dieta suplementada com camu-camu por ter um efeito neuroprotetor no tecido retinal de pacus.

**Palavras-chave:** antioxidante, hiperglicemia, neuroproteção, retinopatia

## 1. INTRODUÇÃO

A retina é a estrutura mais especializada do olho é a encarregada de captar a luz e a transformar em um estímulo luminoso para permitir a visão. Entre as células especializadas, destacam-se os fotorreceptores (bastonetes e cones). Os bastonetes são responsáveis pela captação da visão escura com baixa luminosidade e os cones da visão diurna a cor (Chua et al., 2018). O diabetes mellitus é uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia constante, cujos níveis elevados conduzem severas complicações (Niatz et al., 2018; Sunita Sarangi, 2015). A hiperglicemia é associada ao desenvolvimento de retinopatias diabéticas como principal causa de incapacidade visual e cegueira (Rossino et al., 2019) e alterações morfológicas estão presentes nas camadas da retina (Gleeson et al., 2007) e na sua vascularização (Bek, 2014; Rossino et al., 2019; Witt et al., 2006).

Os peixes apresentam estruturas oculares similares aos outros vertebrados, mas são influenciadas pelos diferentes habitats e tipo de alimentação. Uma grande variabilidade nas estruturas oculares principalmente na retina é reportada entre as diferentes espécies de peixes. Estudos prévios mostraram que a hiperglicemia afeta diversos tecidos oculares entre eles, a retina, um tipo de tecido de alto requerimento de oxigênio ao ser submetido ao exacerbado estresse oxidativo, prejudicando a sua integridade. A capacidade de regeneração dos diversos tecidos nos peixes incluindo os oculares, mantem-se durante a vida toda (Carter-Dawson and Lavail, 1979). As retinas dos teleósteos são comumente utilizadas como modelos experimentais de doenças degenerativas, metabólicas e regenerativas. (Jian et al., 2013; Raja et al., 2016).

O camu-camu (*Myrciaria dubia*) é um fruto da Amazônia peruana, brasileira, venezuelana, colombiana e boliviana. Pertence à família *Myrtaceae* do Gênero *Myrciaria* (Jan et al., 2017) é reconhecido por suas propriedades nutricionais e como insumo na área cosmética e farmacêutica (Emidio et al., 2018; Nascimento et al., 2013), por seu alto nível de vitamina C, flavonoides, antocianinas e carotenoides, o que lhe permite ter propriedades antioxidativas (Neves et al., 2015; Zanatta et al., 2005). A sua capacidade antioxidativa foi demonstrada em estudos experimentais



quando administrada em ratos suplementados com o camu-camu, melhorando a sua atividade antioxidante e reduzindo os níveis de colesterol e triglicerídeos (Any et al., 2014; Nascimento et al., 2013).

As evidências antioxidantes atribuídas ao camu-camu são por seu alto conteúdo de vitamina C. No entanto, não existe descrição na literatura de suplementação de camu-camu em pacu. Por esse motivo, nosso estudo tem o objetivo de avaliar as alterações oftálmicas relativas à retina, provocadas pelo diabetes em peixes pacus (*Piaractus mesopotamicus*), suplementados ou não com camu-camu.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Animais**

A pesquisa foi realizada sob autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - proc. Nº 018718/17) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal-SP. Os preceitos éticos e as diretrizes da “Association for Research in Vision and Ophthalmology - ARVO (National Institutes of Health Publications No 85-23: Revised 1985)”, para a utilização de olhos de animais em ensino ou em pesquisa, foram obedecidos. Duzentos e quarenta peixes, pacus, machos e fêmeas adquiridos em piscicultura comercial com um peso médio de  $213,87 \pm 8,26$  gramas de  $21,19 \pm 0,26$  cm, clinicamente saudáveis e sem alterações oculares após avaliação oftálmica foram selecionados para a pesquisa.

### **2.2. Camu-camu (*Myrciaria dubia*)**

Extrato comercial de camu-camu (*Myrciaria dubia*), foi utilizado no estudo (JALK EIRL, Peru; cod. 107339) e armazenado em sacos de plástico, a 4°C, até seu uso. As concentrações de vitamina C (ácido ascórbico) foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), segundo Campos et al., (2009), e

modificada por Neves et al. (2015). Foi obtido 38,8 mg/g de polpa de camu-camu em pó.

### **2.3. Preparação da dieta**

As dietas experimentais foram preparadas com ingredientes contendo 0 (grupo controle), 500 mg e 1000mg de camu-camu/Kg de ração. A dieta basal (Yunis-Aguinaga et al., 2015), foi misturada e extrusada em molde de 1 mm, sendo o extrato incorporado por pulverização. Os grânulos resultantes foram armazenados a - 4°C para sua utilização (Yunis-Aguinaga et al., 2016).

### **2.4. Avaliação das condições basais relativas à glicemia**

Os animais foram anestesiados por imersão em benzocaína (100 mg/L), até cessarem seus movimentos na água. Em ato contínuo, foram retirados da solução e colocados sobre uma superfície lisa. Procedeu-se à colheita de sangue pela veia caudal (total de 0.3 ml). Completando-se a coagulação, o sangue foi centrifugado a 5000 rpm, por 5 min, para obtenção do soro. O material foi mantido a 4 °C. Foram empregados kit Glicose Liquiform (133-1-Labtest, Lagoa Santa, Brasil) e espectrofotômetro (Biospectro SP-22, Curitiba, Brasil) a 505nm de comprimento de onda.

### **2.5. Indução do diabetes**

A dose de aloxana utilizada foi de 150 mg/Kg (Cueva-Quiroz et al., 2017), por via intravenosa, na veia caudal, diluída em tampão citrato 0,01M pH 4, preparada imediatamente antes do uso, protegida da luz a 4°C. Foram considerados diabéticos os indivíduos que apresentaram valores acima de 130 mL/dL de glicose (XU et al., 2004). A glicemia foi avaliada no quinto dia após a indução (Cueva-Quiroz et al., 2017).

### **2.6 Estudo piloto**

Para determinar o tempo necessário do desenvolvimento de alterações morfológicas e macroscópicas na retina, um estudo piloto foi realizado um ano prévio

à pesquisa demonstrando que em sete dias, os pacus apresentavam diminuição de 45% da espessura da retina, (camadas dos fotorreceptores e camada nuclear interna principalmente), presença de IRMAS, em pelo menos um quadrante e atrofia da retina.

## **2.7 Delineamento experimental**

Os pacus foram distribuídos aleatoriamente em 24 tanques de 1500 litros de capacidade (10 peixes / tanque), com fluxo contínuo de recirculação fechado. Cada tratamento foi constituído por duas réplicas. A dieta foi fornecida por sete dias. No período experimental, a qualidade da água permaneceu no conforto dos indivíduos (O:  $4,2 \pm 0,36$ ; pH:  $6,88 \pm 0,1$ ; T°:  $27,32 \pm 0,17$ ), determinada mediante uma sonda de parâmetros múltiplos (YSI Model MPS 556, Chicago, U.S.), e as concentrações de amônia ( $0,11 \pm 0,021$  mg/L), nitrato ( $0,13436 \pm 0,0073$  mg/L) e nitrito ( $0,13436 \pm 0,0073$  mg/L). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, correspondente 3% da sua biomassa.

Foram constituídos 6 grupos:

- ND0 (n=40): ambos os olhos de peixes não diabéticos com ração convencional;
- ND500 (n=40) ambos os olhos de peixes não diabéticos com ração convencional suplementado com 500 mg/kg de camu-camu;
- ND1000 (n=40) ambos os olhos de peixes não diabéticos com ração convencional suplementado com 1000 mg/kg de camu-camu;
- D0 (n=40) olhos de pacus diabéticos com ração convencional;
- D500 (n=40) ambos os olhos de peixes diabéticos com ração convencional suplementado com 500 mg/kg de camu-camu;
- D1000 (n=40) ambos os olhos de peixes diabéticos com ração convencional suplementado com 1000 mg/kg de camu-camu.

## **2.8 Protocolos de avaliação oftálmica**

Parâmetros foram avaliados em todos os grupos após sete dias de receber o alimento suplementado ou não. A avaliação da retina foi realizada mediante a retinografia e eletrorretinografia.

### 2.8.1 Padronização da técnica de eletrorretinografia

A ERG foi realizada utilizando-se o eletrorretinógrafo (HMsERG, RetVet Corp. Inc. Columbia, MO, U.S.A.), em ambos os olhos. Para isto, os peixes foram submetidos à anestesia por imersão em solução de benzocaína (100 mg/L) (Sigma-Aldrich Laboratory, Steinheim, Germany), até seus movimentos cessarem. Foram colocados em posição lateral, sobre uma esponja molhada em um recipiente e um pequeno tubo foi inserido 2 a 3 centímetros na cavidade bucal (Mesinger and Powers, 1999), mediante um sistema de recirculação simples (Neiffer and Stamper, 2009; Stetter, 2001), com anestesia de manutenção de (50 mg/L).

Para mensuração das amplitudes e tempo implícito das ondas **a** e **b**, na fase escotópica (bastonetes e resposta mista), o exame foi realizado em ambiente escuro após duas horas e meia de adaptação (Demarco and Powers, 1989; Rushton, 1966, Falzett et al., 1988; Lin and Yazulla, 1994). Para a fase fotópica (cones), houve um intervalo de 10 minutos de adaptação à luz (Burkhard, 1965). O eletrodo terra foi posicionado na região da crista supraoccipital e o eletrodo referência inserido na região retro bulbar em posição entre as seis e sete horas.

Por fim, o eletrodo ativo em formato 24"7 (Ocuscience, Kansas, US), utilizado experimentalmente para olhos de menor tamanho, foi fixado na interface eletrodo-córnea com solução viscoelástica hialuronato de sódio a 1% (Provisc®, Alcon laboratórios do Brasil, São Paulo, SP), posteriormente à instilação de colírio anestésico a base de proximetacaína 0,5% (Anestalcon, Alcon laboratórios do Brasil, São Paulo). Todos os eletrodos conectavam em um pré-amplificador e os sinais recebidos foram processados em um filtro. Decorridos os exames, as ondas **a** e **b** tiveram suas amplitudes e tempos implícitos. Ato contínuo, procedeu-se à análise estatística e interpretação que ocorreu em software específico.

### 2.8.2 Retinografia

O registro do fundo do olho foi realizado com equipamento para documentação digital (Topcon TCR-50DX, Tokyo, Japan) em triplicata, sendo, pelo menos uma, centralizada no disco ótico com o auxílio de uma lente de auxiliar. Foram avaliadas e categorizadas as alterações em retina central, identificando lesões microvasculares

em diversos graus de retinopatia diabética não proliferativa (RDNP), nos quatro quadrantes avaliados: sem lesão, leve, moderada e severa, tomando como base uma modificação da categorização descrita anteriormente por Viswanath and McGavin, 2003, apresentado na tabela 1 junto ao seu escore correspondente de acordo com a severidade da RDNP (0-3).

Tabela 1. Classificação clínica de RDNP no pacu diabético considerada para as avaliações à retinografia

| <b>Escore</b> | <b>Grau</b> | <b>Lesões</b>                                |
|---------------|-------------|----------------------------------------------|
| 0             | Sem lesão   | Nenhuma                                      |
| 1             | Leve        | Microaneurismas, hemorragias                 |
| 2             | Moderado    | Leves IRMAs (diminuição do calibre vascular) |
| 3             | Severo      | Severos IRMAs pelo menos em um quadrante     |

## 2.9 Eutanásia e colheita dos olhos

Os peixes diabéticos e não diabéticos, após sete dias de indução, e não diabéticos, foram submetidos à eutanásia ativa com benzocaína (1g/10L), em submersão. Os olhos foram colhidos após hemidissecção do encéfalo (Glesson et al., 2007). As amostras foram fixadas em formalina tamponada 10% (10% neutral buffered formalin, Thermo electron corporation, Cheshire, UK) por 48 horas até o momento da inclusão em parafina histológica. O material foi submetido a cortes seriados de 5  $\mu$ m e corados por hematoxilina de Harrys e Eosina de Lyson (LabSynth, Diadema, SP, Brasil). Os cortes foram realizados em forma transversal até atingir o nervo óptico. No momento da eutanásia os valores de glicemia sérica média eram de  $59,71 \pm 2,08$  mg/dL para peixes do grupo ND0, de  $80,79 \pm 8,53$  mg/dL para os peixes do grupo ND500,  $75,16 \pm 3,29$  mg/dL, para os peixes do grupo ND1000, de  $159,04 \pm 16,41$  mg/dL para o grupo D0,  $197,34 \pm 22,45$  mg/dL para o grupo D500 e  $178,24 \pm 11,50$  mg/dL para o grupo D1000.

## 2.10 Histomorfometria

Para a histomorfometria, foi realizada com o auxílio de um programa de análise de imagens StenCells (Stencells v.1.5 Tokyo, Japan), em microscópio óptico convencional, equipado com uma câmera digital (Olympus DP72, Miami, U.S.A.). Seis imagens (campos), foram obtidas de cada lâmina (objetiva 40X), contemplando-se

toda a extensão da retina, da ora serrata a ora serrata, incluindo-se a cabeça do nervo óptico (Figura 3A), em sua porção central (Figura 3B). Em cada campo realizaram-se cinco avaliações, equidistantes, da espessura total da retina, bem como das espessuras de cada uma de suas camadas (Figura 5). Foram mensuradas as regiões: posterior, média ou intermedia e anterior (Figura 6).

### **2.11 Histopatologia e IQ**

Para a histopatologia, avaliou-se descritivamente a presença de alterações nos âmbitos celulares (picnólise), inflamatórios (infiltrado), tecidual (atrofia) e vascular (congestão) (Schmid, 2014). Para a técnica de IQ, os cortes parafinados de retina foram submetidos à imunodeteção dos anticorpos anti-caspase 3 (Abcam, cód. ab13847, 1:100, USA) e anti-caspase 9 (Abcam, cód. ab52298, 1:250 USA). A recuperação antigênica foi com tampão citrato pH. 6.0. Como complemento e conjugado (kit Abcam ab236466 - Mouse and Rabbit specific HRP/DAB IHC detection - Micropolymer). O cromógeno usado foi 3-3'-diaminobenzidina DAB (kit Abcam ab236466 - Mouse and Rabbit specific HRP/DAB IHC detection - Micropolymer). Para a contra-coloração foi utilizada Hematoxilina de Harris. As lâminas foram examinadas por microscopia de luz com ampliação de (40x) e classificadas de forma semiquantitativa para determinar a porcentagem de células positivas (0 - sem coloração, 1 - 1-25%, 2 - 26-50%, 3 - 51-75%, 4 - >76%), e a intensidade da coloração (1- fraca, 2 - moderada, 3 - forte). A pontuação final foi definida como o produto da pontuação percentual multiplicada pela pontuação de intensidade (Erza-Elia et al., 2016).

### **2.12 Avaliação do índice apoptótico (Teste TUNEL)**

Para a avaliação do índice apoptótico, foi utilizado o kit TUNEL. Depois de desparafinados e desidratados, os cortes de retina foram incubados com a enzima Proteinase K (20 min, temp. ambiente), seguido da aplicação de peróxido de hidrogênio (5 min, temp. ambiente), aplicação do tampão de equilíbrio TdT (30 min, temp. ambiente), aplicação da enzima TdT (uma hora e meia, em câmara umidificada, temp. ambiente), seguido da utilização do tampão de parada (5 min, temp. ambiente); seguiu-se com o tampão de bloqueio (10 min, temp. ambiente) para então aplicar o

cromógeno DAB; por fim, a contra coloração foi realizada com verde de Metila (3 min), para serem reidratadas montadas. Entre cada passo os cortes receberam um banho com tampão de lavagem TRIS HCL pH 7,4 (5 min, temp. ambiente). O índice apoptótico foi determinado por contagem da porcentagem de células positivas de pelo menos 500 núcleos subdivididos em 10 campos ao azar usando o objetivo de 40X (Wu et al., 2013).

### 2.13 Estatística

Valores da amplitude, tempo da ERG e da espessura total da retina e suas camadas, quantificação histológica de vasos e do índice apoptótico, foram avaliados quanto à sua normalidade, aplicando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. As mesmas variáveis foram avaliadas empregando-se análise de Variância (ANOVA), com o pós-teste de Tukey. Quanto as avaliações clínicas dos tipos de RDNP, empregou-se análise teste de Kruskall Wallis e comparação múltipla de Dunn. E. Os resultados foram expressos em médias e erro padrão. Foi utilizada, em todas as análises, nível de significância estatística se  $p < 0,05$ . Os cálculos e gráficos foram realizadas usando o software <https://www.graphpad.com/demos/>.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Eletroretinografia (ERG)

O registro da realização da ERG para as fases escotópica e fotópica nos pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados são apresentadas na figura 1.

#### 3.1.1. Fase escotópica de baixa amplitude (avaliação de bastonetes)

As amplitudes das ondas **a** e **b**, nos períodos de resposta aos bastonetes, variaram como pode ser observado na tabela 2. Observou-se diferença estatística na onda **a** entre os grupos ND0 e D1000 e seus tempos implícitos correspondentes, mostraram diferença significativa entre os grupos ND0, D500 e D1000 ( $p < 0,05$ ). A amplitude da onda **b** não houve diferença estatística entre os grupos. No entanto, seus tempos implícitos correspondentes mostraram diferença significativa entre os grupos ND0, ND500 ao serem comparados com o grupo D500 ( $p < 0,05$ ) (Figura 2).

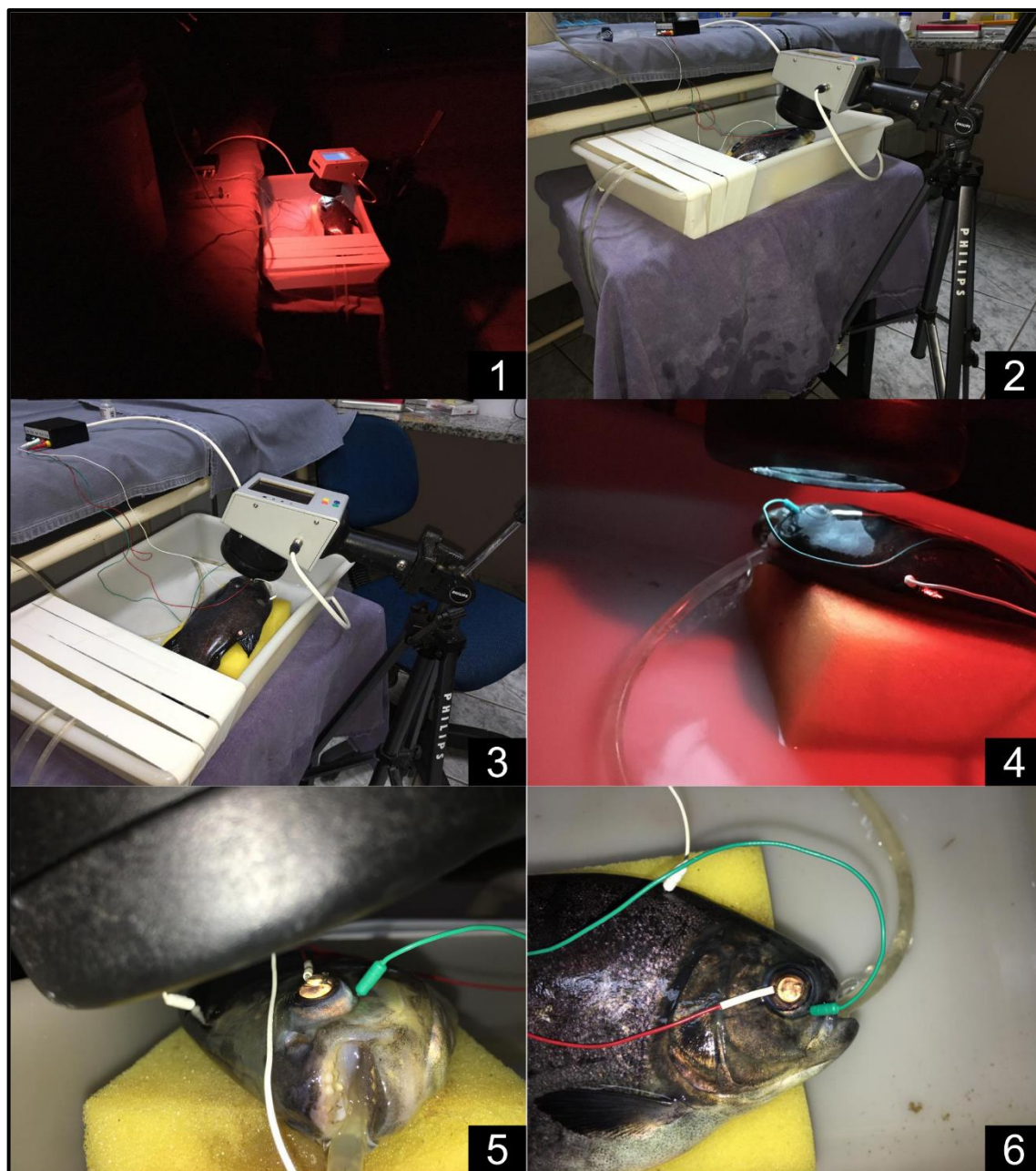


Figura 1. Sequência da realização do ERG no pacu. 1: adaptação em ambiente ao escuro sob anestesia em um sistema recirculação simples com o uso do HMSeRG em pacu anestesiado. 2: adaptação a fase clara. 3: posicionamento sobre uma esponja molhada do pacu durante a realização do ERG. 4: ERG na fase escura observa-se o posicionamento do tubo inserido na cavidade bucal durante a anestesia de manutenção. 5: Vista frontal do pacu entubado sob anestesia de manutenção e posicionamento do eletrodo terra às 5 horas. 6: Vista lateral do posicionamento dos três eletrodos do ERG no pacu anestesiado. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.



Tabela 2. Valores do ERG em pacus, apresentados como médias e erro padrão da amplitude do ERG e tempo implícito da fase escotópica (bastonetes).

| Grupo  | Amplitude a ( $\mu$ V)         | Amplitude b ( $\mu$ V) | Tempo a (ms)     | Tempo b (ms)                   |
|--------|--------------------------------|------------------------|------------------|--------------------------------|
| ND0    | 6,63 $\pm$ 1,63 <sup>a</sup>   | 34,14 $\pm$ 4,17       | 25,19 $\pm$ 2,45 | 94,07 $\pm$ 7,28 <sup>a</sup>  |
| D0     | 16,13 $\pm$ 2,02 <sup>b</sup>  | 40,39 $\pm$ 6,66       | 25,44 $\pm$ 0,98 | 89,96 $\pm$ 4,45 <sup>ab</sup> |
| D500   | 12,18 $\pm$ 2,20 <sup>ab</sup> | 29,82 $\pm$ 6,68       | 31,79 $\pm$ 2,34 | 60,73 $\pm$ 3,05 <sup>b</sup>  |
| D1000  | 20,22 $\pm$ 2,69 <sup>b</sup>  | 41,09 $\pm$ 3,48       | 25,84 $\pm$ 1,39 | 80,33 $\pm$ 9,72 <sup>ab</sup> |
| ND500  | 12,90 $\pm$ 1,13 <sup>ab</sup> | 30,69 $\pm$ 1,25       | 27,51 $\pm$ 1,67 | 100,47 $\pm$ 3,36 <sup>a</sup> |
| ND1000 | 13,60 $\pm$ 2,19 <sup>ab</sup> | 39,20 $\pm$ 5,01       | 27,12 $\pm$ 2,60 | 74,71 $\pm$ 5,02 <sup>ab</sup> |

Médias seguidas de pelo menos por uma letra minúscula diferente indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

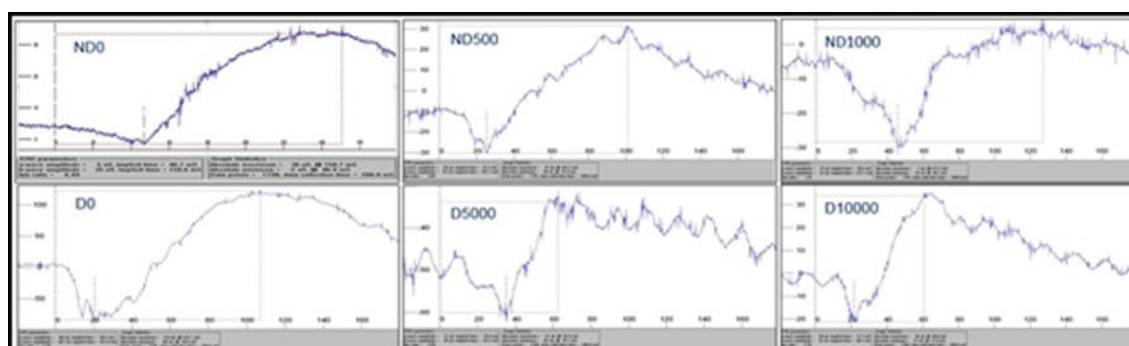


Figura 2. Eletroretinograma em flash, durante a fase de adaptação escotópica de baixa amplitude em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem tratamento), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil.

### 3.1.2. Fase escotópica de alta amplitude (resposta mista de cones e bastonetes)

Na resposta mista das ondas **a** e **b**, as médias variaram segundo a tabela 3, respectivamente. Observou-se diferença estatística na onda **a** entre os grupos D0, ND0 e D500 ( $p < 0,05$ ). Não foi observada diferença estatística nas amplitudes da onda **b** e em seus tempos implícitos de ambas as ondas entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 3).

Tabela. 3. Valores do ERG em pacus, apresentados como médias e erro padrão da amplitude do ERG e tempo implícito da fase escotópica (mista).

| Grupo  | Amplitude a ( $\mu\text{V}$ )    | Amplitude b ( $\mu\text{V}$ ) | Tempo a (ms)       | Tempo b (ms)       |
|--------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|
| ND0    | 40,7615 $\pm$ 6,62 <sup>a</sup>  | 106,30 $\pm$ 11,87            | 29,5077 $\pm$ 2,76 | 111,22 $\pm$ 8,09  |
| D0     | 79,1950 $\pm$ 5,78 <sup>b</sup>  | 127,72 $\pm$ 19,09            | 24,7167 $\pm$ 2,52 | 129,11 $\pm$ 12,15 |
| D500   | 43,7250 $\pm$ 3,98 <sup>a</sup>  | 83,14 $\pm$ 11,51             | 25,1460 $\pm$ 3,70 | 132,13 $\pm$ 17,08 |
| D1000  | 72,2917 $\pm$ 9,93 <sup>ab</sup> | 119,15 $\pm$ 15,45            | 19,5917 $\pm$ 2,60 | 123,81 $\pm$ 7,60  |
| ND500  | 58,4917 $\pm$ 5,24 <sup>ab</sup> | 95,7 $\pm$ 2,84               | 27,4533 $\pm$ 4,03 | 140,06 $\pm$ 2,44  |
| ND1000 | 56,7717 $\pm$ 7,21 <sup>ab</sup> | 98,3 $\pm$ 18,07              | 24,3750 $\pm$ 3,31 | 133,88 $\pm$ 11,22 |

Médias seguidas de pelo menos por uma letra minúscula diferente indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

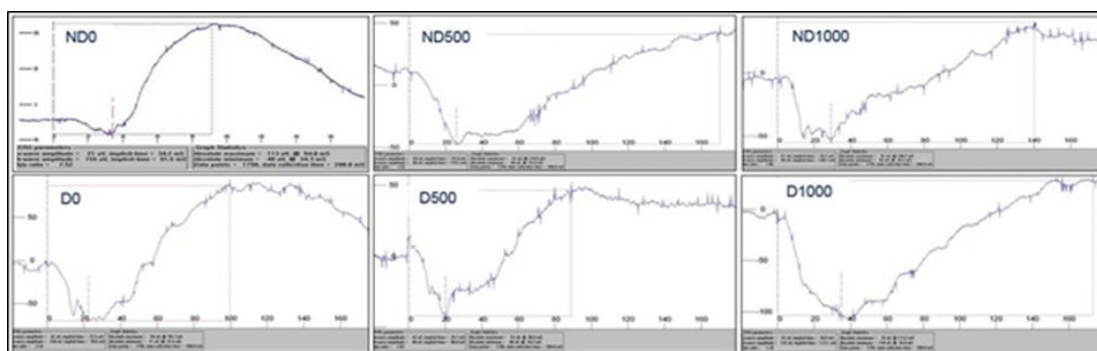


Figura 3. Eletroretinograma em flash, durante a fase de adaptação escotópica de alta amplitude em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem tratamento), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil.

### 3.1.3. Fase fotópica (resposta de cones)

Os valores da amplitude e tempo implícito das ondas **a** e **b** as medias variaram segundo a tabela 4. Não foi observada diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 4).

Tabela 4. Valores do ERG em pacus, apresentados como médias e erro padrão da amplitude do ERG e tempo implícito da fase fotópica (cones).

| Grupo  | Amplitude a ( $\mu\text{V}$ ) | Amplitude b ( $\mu\text{V}$ ) | Tempo a (ms)     | Tempo b (ms)     |
|--------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|
| ND0    | 28,5714 $\pm$ 8,11            | 81,29 $\pm$ 25,26             | 15 $\pm$ 3,44    | 50,56 $\pm$ 7,69 |
| D0     | 40,1667 $\pm$ 6,70            | 104,43 $\pm$ 20,98            | 15,27 $\pm$ 0,48 | 58,57 $\pm$ 2,94 |
| D500   | 26,6667 $\pm$ 3,71            | 81,67 $\pm$ 12,14             | 20,17 $\pm$ 4,09 | 68,12 $\pm$ 7,86 |
| D1000  | 41,0000 $\pm$ 8,83            | 126 $\pm$ 28,09               | 17,54 $\pm$ 5,01 | 57,5 $\pm$ 8,91  |
| ND500  | 32,8000 $\pm$ 6,81            | 96 $\pm$ 3,06                 | 15,24 $\pm$ 0,31 | 61,1 $\pm$ 0,99  |
| ND1000 | 41,4000 $\pm$ 9,74            | 118,4 $\pm$ 25,12             | 14,2 $\pm$ 0,63  | 53,04 $\pm$ 3,34 |

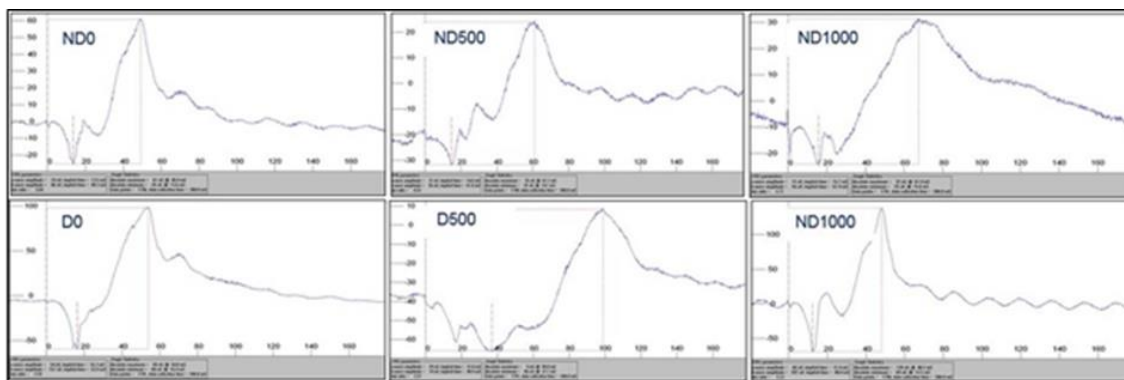


Figura 4. Eletroretinograma flash, durante a fase clara (cones), em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem tratamento), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil.

### 3.2. Retinografia

A avaliação a retinografia (Figura 5), revelou que os grupos ND0, ND500 e ND1000, apresentaram retina sem alterações, com vascularização normal e características normais do processo falciforme. O grupo D0 apresentou retina sem presença de vascularização na região central em todos os quadrantes (IRMAS severos) e atrofia de retina, classificando-se como RDNP severa; o grupo D500 apresentou retina com diminuição do calibre de vasos em, pelo menos, um quadrante (principalmente no IV quadrante), correspondendo a presença de IRMAS moderados, classificando-se como RDNP moderada; o grupo D1000, as retinas apresentaram diminuição do calibre dos vasos (nos quadrantes I, II e IV), que corresponde a IRMAS severos, classificando-se como RDNP severa, observou-se também a vascularização que acompanha o processo falciforme diminuída (Figura 6). A avaliação do score clínico em todos os grupos não diabéticos mostrou um valor de 0 correspondendo a ausência de alterações retinianas. O grupo D0 teve maior escore (3) em comparação com os grupos diabéticos suplementados com camu-camu ( $p < 0,05$ ). O grupo D500 mostrou uma tendência de menor lesão ao apresentar menor escore (2,5), ao ser comparada com o grupo D1000 (2,83) (Tabela 5).



Figura 5. Imagens fotográficas colhidas de pacus submetidos à retinografia. Em A: animal sob contenção manual para a realização do exame. Em B: Observa-se o posicionamento do peixe adjunto à lente manual de 20 dioptrias para o registro das imagens. Serviço de Oftalmologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2019.

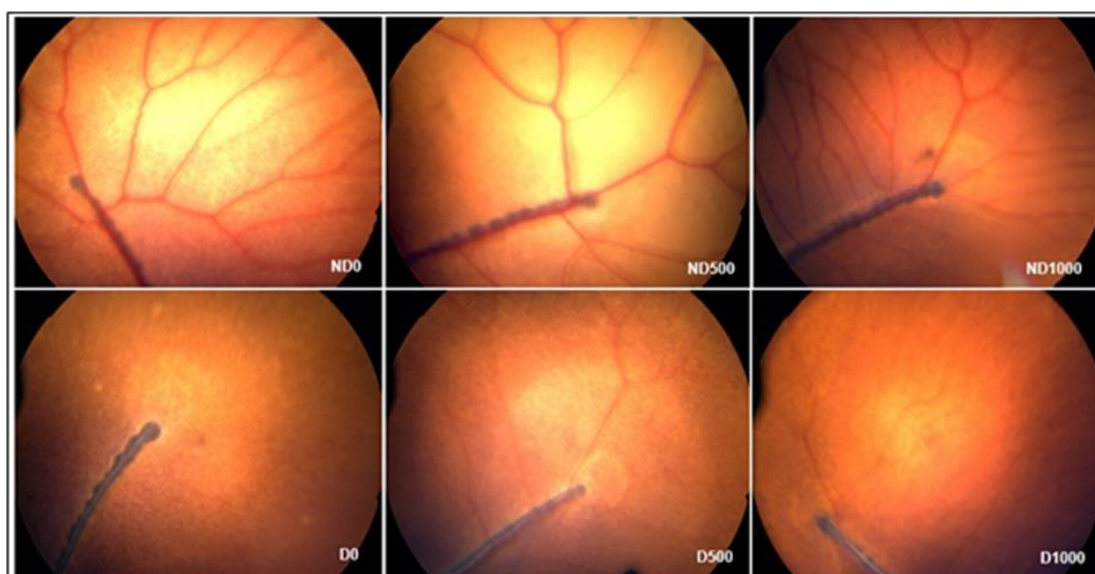


Figura 6. Imagem representativa dos fundos dos olhos do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com camu-camu. com as características das alterações de vascularização segundo o seu grupo correspondente e presença do processo falciforme na região dorsal. FCAV-Unesp, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil. Note-se a retina centralizada.

Tabela 5. Escore clínico de lesões (média  $\pm$  SD) em pacus suplementados com extrato seco de camu-camu.

|                   | Não diabéticos |     |      | Diabéticos |                   |                  |
|-------------------|----------------|-----|------|------------|-------------------|------------------|
|                   | 0              | 500 | 1000 | 0          | 500               | 1000             |
| Olho direito      | 0B             | 0B  | 0B   | 3 $\pm$ 0A | 2,50 $\pm$ 0,54AB | 2,83 $\pm$ 0,41A |
| Olho esquerdo     | 0B             | 0B  | 0B   | 3 $\pm$ 0A | 2,50 $\pm$ 0,54AB | 2,83 $\pm$ 0,41A |
| Média do paciente | 0B             | 0B  | 0B   | 3 $\pm$ 0A | 2,50 $\pm$ 0,54AB | 2,83 $\pm$ 0,41A |

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as medianas dos grupos segundo teste de Kruskal Wallis e comparação múltipla de Dunn. Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Campus de Jaboticabal SP, Brasil.

### 3.3. Histopatologia e IQ

Imagens representativas da realização da avaliação morfométrica, Cortes de retinas do pacu (Figura 7), camadas da retina do pacu (Figura 8), regiões da retina avaliadas (Figura 9) são apresentados.

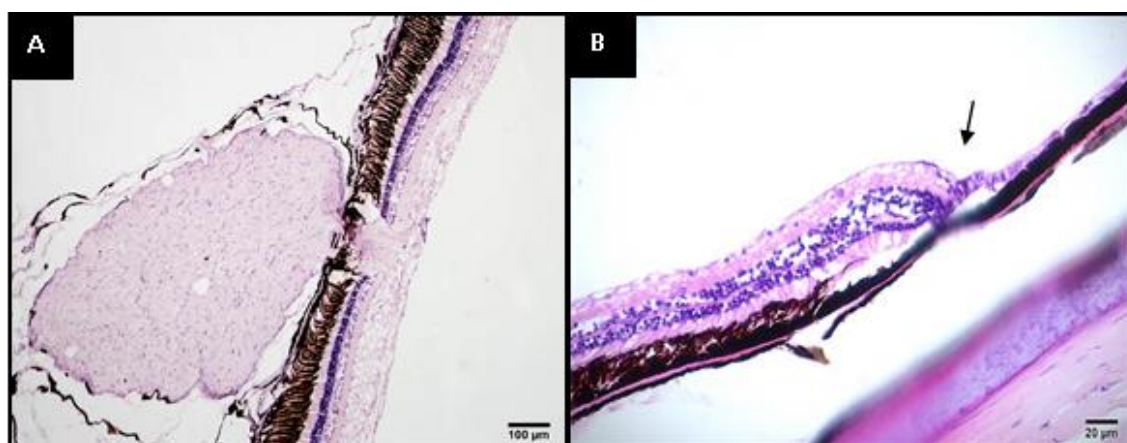


Figura 7. Fotomicrografia de cortes (5 $\mu$ m) de retinas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Em A: porção da retina posterior com a cabeça do nervo óptico (coloração de hematoxilina e eosina, 10X) B: Observa-se a ora serrata (coloração de hematoxilina e eosina, 40X) (seta). FCAV- Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.



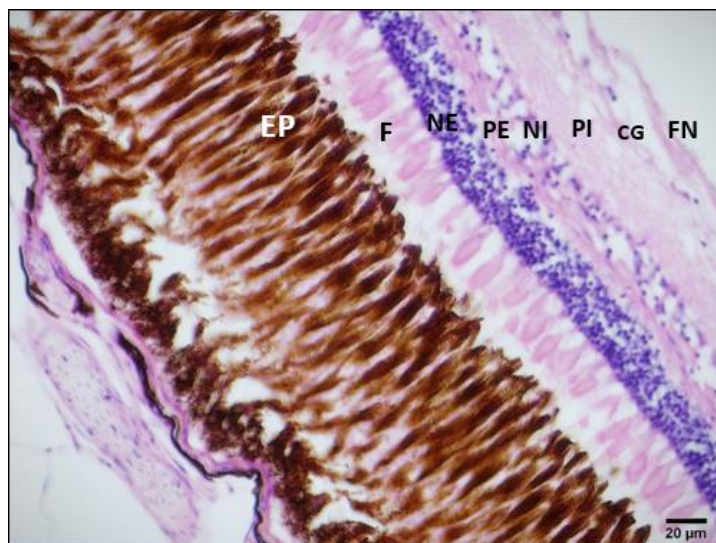


Figura 8. Fotomicrografia de corte (5μm) de retina de pacu (coloração de hematoxilina e eosina, 20X). Notem-se o EP: epitélio pigmentário; F: fotorreceptores; NE: camada nuclear externa; PE: camada plexiforme externa; NI: camada nuclear interna; PI: camada plexiforme interna, CG: células ganglionares; FN: Fibras nervosas de peixes pacus (*Piaractus mesopotamicus*). Laboratório de Ictiopatologia, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil.

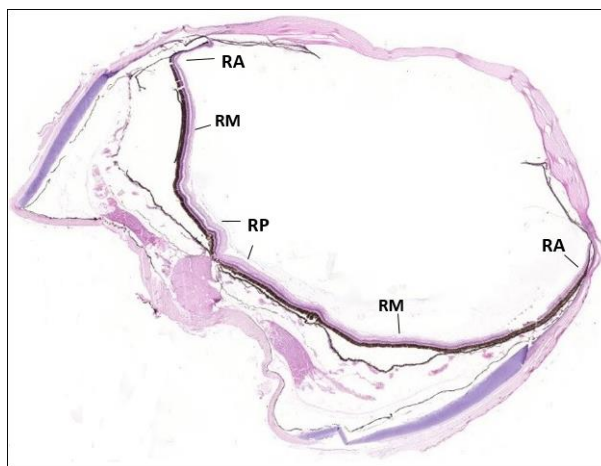


Figura 9. Fotomicrografia de retina no pacu (*Piaractus mesopotamicus*) representando as regiões estudadas por campo, para a avaliação da espessura total da retina em pacus. **RP**: retina posterior em contato com o nervo óptico, **RM**: retina média ou intermedia e **RA**: retina anterior em direção ao corpo ciliar. FCAV- Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2020.

### 3.3.1. Morfometria

Na avaliação da retina total, as médias da espessura variaram e estão representadas na tabela 6. Observou-se diminuição da espessura no grupo D0, quando comparado aos grupos ND0, ND500 e ND1000 ( $p < 0,05$ ) (Figura 10).

Tabela 6. Espessura da retina total em pacus suplementados com camu-camu.

| Grupo  | Espessura ( $\mu\text{m}$ ) | Média                           |
|--------|-----------------------------|---------------------------------|
| ND0    | 210,11 - 232,98             | $221,55 \pm 3,68 \mu\text{m}^b$ |
| ND500  | 195,9 - 245                 | $213,5 \pm 6,96 \mu\text{m}^b$  |
| ND1000 | 197,5 - 238,5               | $214,3 \pm 6,99 \mu\text{m}^b$  |
| D0     | 146,1 - 187                 | $169,81 \pm 7,52 \mu\text{m}^a$ |
| D500   | 170,5 - 220,03              | $197,2 \pm 6,99 \mu\text{m}^a$  |
| D1000  | 190,9 - 231,6               | $204,5 \pm 5,69 \mu\text{m}^a$  |

Médias seguidas de pelo menos por uma letra minúscula diferente indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

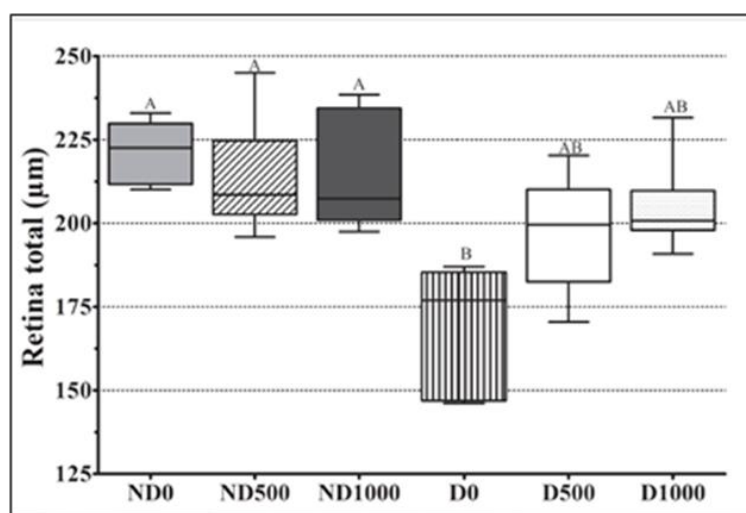


Figura 10. Médias e erro padrão relativos à espessura da retina total em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem tratamento), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. \*Médias seguidas de pelo menos por uma letra maiúscula diferente indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Na retina posterior, as médias da espessura variaram e estão apresentadas na tabela 7, houve diminuição da espessura no grupo D0, quando comparado aos grupos ND0 e ND500 ( $p<0,05$ ) (Figura 11).

Tabela 7. Espessura da retina posterior em pacus suplementados com camu-camu.

| Grupo  | Espessura ( $\mu\text{m}$ ) | Média                               |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|
| ND0    | 168,23 - 327,03             | $284,65 \pm 23,91 \mu\text{m}^a$    |
| ND500  | 268,3 - 330                 | $291,6 \pm 9,82 \mu\text{m}^a$      |
| ND1000 | 246,9 - 285,1               | $265,16 \pm 5,55 \mu\text{m}^{ab}$  |
| D0     | 165,1 - 236,80              | $216,95 \pm 14 \mu\text{m}^b$       |
| D500   | 210,7 - 284                 | $264,4 \pm 11,17 \mu\text{m}^{ab}$  |
| D1000  | 234,12 - 297,58             | $264,58 \pm 10,68 \mu\text{m}^{ab}$ |

Médias seguidas de pelo menos por uma letra minúscula diferente indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ).

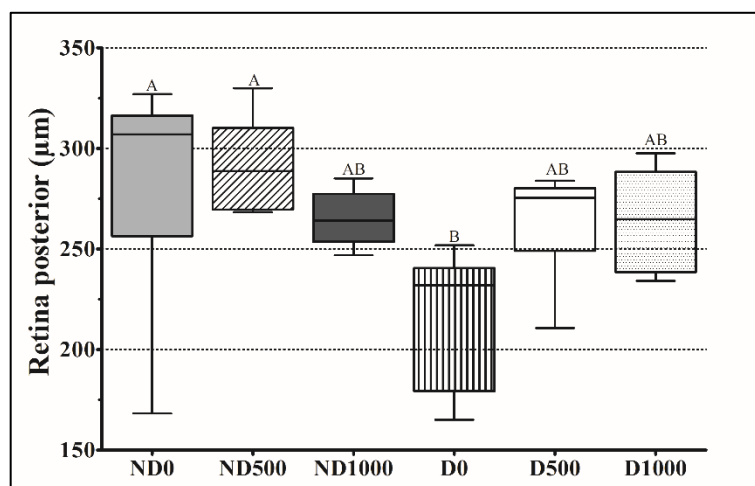


Figura 11. Médias e erro padrão relativos à espessura da retina posterior em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg/Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem tratamento), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. \*Médias seguidas de pelo menos por uma letra maiúscula diferente indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ).

A morfometria da retina anterior variou e está representada na tabela 8. Não foi observada diferença estatística entre todos os grupos ( $p>0,05$ ) (Figura 12).



Tabela 8. Espessura da retina anterior em pacus suplementados com camu-camu.

| Grupo  | Espessura ( $\mu\text{m}$ ) | Média                        |
|--------|-----------------------------|------------------------------|
| ND0    | 53,75 -104,68               | $80,19 \pm 7,86 \mu\text{m}$ |
| ND500  | 39,2-95,4                   | $68,8 \pm 8,04 \mu\text{m}$  |
| ND1000 | 57,8-94,4                   | $78,77 \pm 5,76 \mu\text{m}$ |
| D0     | 62,35 -70,89                | $66,38 \pm 1,28 \mu\text{m}$ |
| D500   | 58,4 - 82,4                 | $73,5 \pm 3,89 \mu\text{m}$  |
| D1000  | 61,19 - 99,86               | $82,02 \pm 5,43 \mu\text{m}$ |

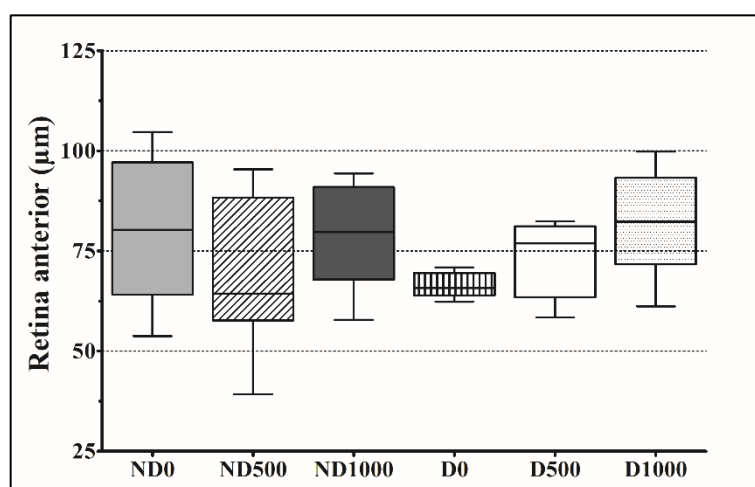


Figura 12. Médias e erro padrão da espessura da retina anterior em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (sem suplementação), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem tratamento), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil.

Na camada do epitélio pigmentado as médias da espessura variaram e estão representadas na tabela 9. Observou-se diminuição significativa do grupo D0 em relação ao grupo ND500 ( $p < 0,05$ ) (Figura 13).

Tabela 9. Espessura do epitélio pigmentado em pacus suplementados com camu-camu.

| Grupo  | Espessura ( $\mu\text{m}$ ) | Média                                    |
|--------|-----------------------------|------------------------------------------|
| ND0    | 75,7 - 99,86                | $88,45 \pm 3,34 \mu\text{m}^{\text{ab}}$ |
| ND500  | 62,75 - 112,73              | $94,21 \pm 7,73 \mu\text{m}^{\text{a}}$  |
| ND1000 | 73,5 - 134,4                | $91,63 \pm 9,26 \mu\text{m}^{\text{ab}}$ |
| D0     | 54,6 - 80,7                 | $65,96 \pm 4,61 \mu\text{m}^{\text{b}}$  |
| D500   | 71,1 - 90,4                 | $81,50 \pm 2,94 \mu\text{m}^{\text{ab}}$ |
| D1000  | 77,6 - 138,3                | $93,15 \pm 9,42 \mu\text{m}^{\text{ab}}$ |

Médias seguidas de pelo menos por uma letra minúscula diferente indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

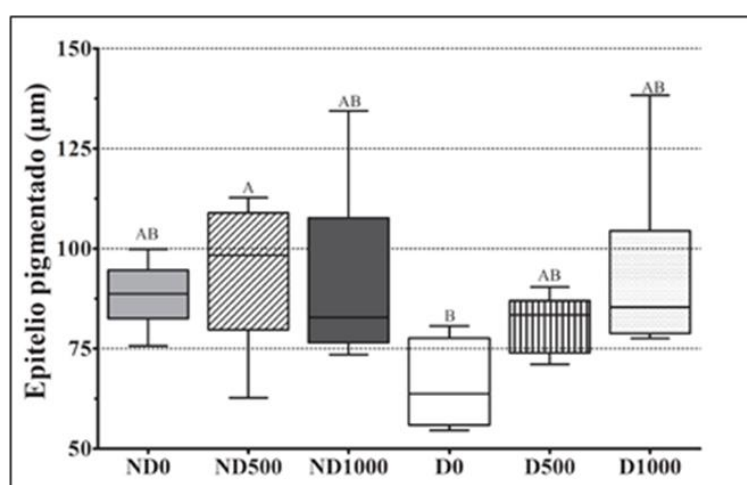


Figura 13. Médias e erro padrão relativos à espessura da camada do epitélio pigmentar em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem tratamento), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. \*Médias seguidas de pelo menos por uma letra maiúscula diferente indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Na camada dos fotorreceptores, as médias da espessura variaram e estão representadas na tabela 10. O grupo D0 apresentou diminuição significativa ao ser comparado com todos os outros grupos ( $p < 0,05$ ) (Figura 14).

Tabela 10. Espessura dos fotorreceptores em pacus suplementados com camu-camu.

| Grupo  | Espessura ( $\mu\text{m}$ ) | Média                            |
|--------|-----------------------------|----------------------------------|
| ND0    | 96,05 - 134,07              | 110,71 $\pm$ 5,66 $\mu\text{m}$  |
| ND500  | 84,02 - 115,96              | 102,6 $\pm$ 5,19 $\mu\text{m}$   |
| ND1000 | 97,8 - 118,6                | 105,15 $\pm$ 3,33 $\mu\text{m}$  |
| D0     | 62,4 - 98,8                 | 77,23 $\pm$ 6,57 $\mu\text{m}^*$ |
| D500   | 90 - 131                    | 103,5 $\pm$ 5,99 $\mu\text{m}$   |
| D1000  | 96,4 - 119,9                | 103,28 $\pm$ 3,54 $\mu\text{m}$  |

\*Médias diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) de todos os outros grupos.

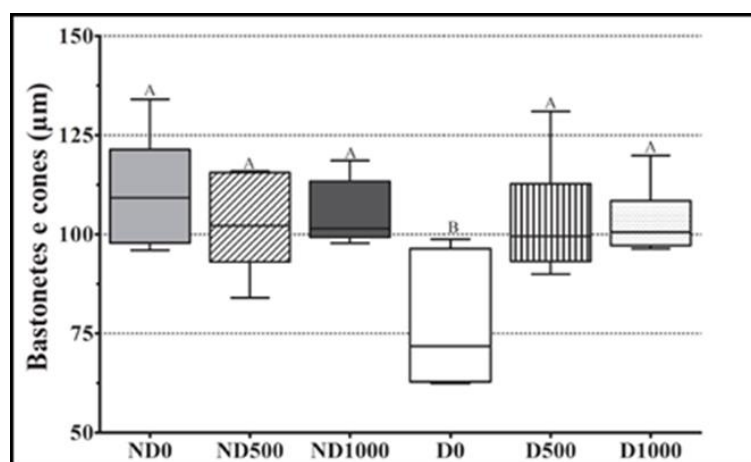


Figura 14. Médias e erro padrão relativos à espessura da camada dos fotorreceptores em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem suplementação), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. \*Médias seguidas de pelo menos por uma letra maiúscula diferente indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Na camada nuclear externa, as médias variaram e estão representadas segundo a tabela 11. Observou-se também diminuição da espessura no grupo D0 quando comparado com os grupos ND1000 e D1000 ( $p < 0,05$ ) (Figura 15).

Tabela 11. Espessura da camada nuclear externa em pacus suplementados com camu-camu.

| Grupo  | Espessura ( $\mu\text{m}$ ) | Média                                     |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------------|
| ND0    | 20,7 - 23,17                | $21,95 \pm 0,41 \mu\text{m}^{\text{abc}}$ |
| ND500  | 17,16 - 23,43               | $19,07 \pm 0,93 \mu\text{m}^{\text{bc}}$  |
| ND1000 | 20,1 - 26,7                 | $22,63 \pm 1 \mu\text{m}^{\text{ab}}$     |
| D0     | 15,1 - 20,2                 | $18,39 \pm 0,71 \mu\text{m}^{\text{c}}$   |
| D500   | 17,3 - 24,1                 | $20,1 \pm 1,11 \mu\text{m}^{\text{abc}}$  |
| D1000  | 20,7 - 28,1                 | $23,57 \pm 1,10 \mu\text{m}^{\text{a}}$   |

Médias seguidas de pelo menos por uma letra minúscula diferente indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

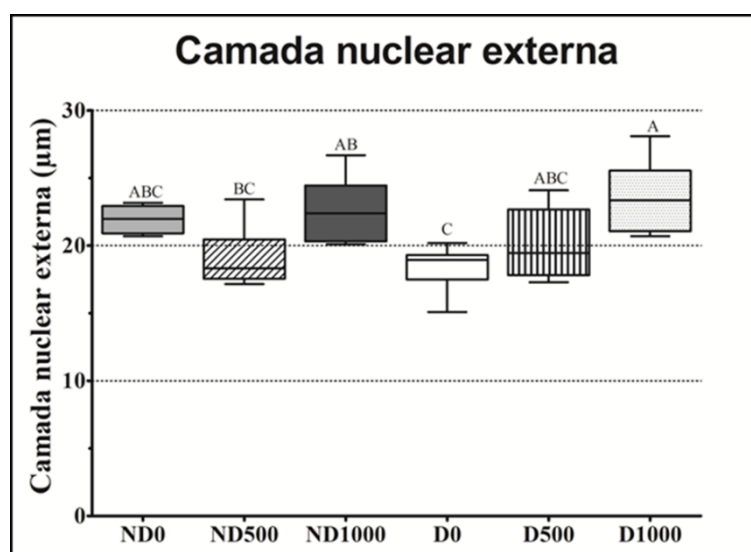


Figura 15. Médias e erro padrão relativos à espessura da camada nuclear externa em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem suplementação), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. \*Médias seguidas de pelo menos por uma letra maiúscula diferente indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Na camada plexiforme externa, as médias variaram e estão representadas na tabela 12. Não houve diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 16).

Tabela 12. Espessura da camada plexiforme externa em pacus suplementados com camu-camu.

| Grupo  | Espessura ( $\mu\text{m}$ ) | Média                       |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|
| ND0    | 6,21 - 10,08                | $7,92 \pm 0,61 \mu\text{m}$ |
| ND500  | 6 - 8                       | $7 \pm 0,33 \mu\text{m}$    |
| ND1000 | 6,03 - 8,8                  | $7,42 \pm 0,33 \mu\text{m}$ |
| D0     | 5,8 - 6,7                   | $6,06 \pm 0,15 \mu\text{m}$ |
| D500   | 5,1 - 7,7                   | $6,4 \pm 0,38 \mu\text{m}$  |
| D1000  | 5,5 - 8,3                   | $6,71 \pm 0,39 \mu\text{m}$ |

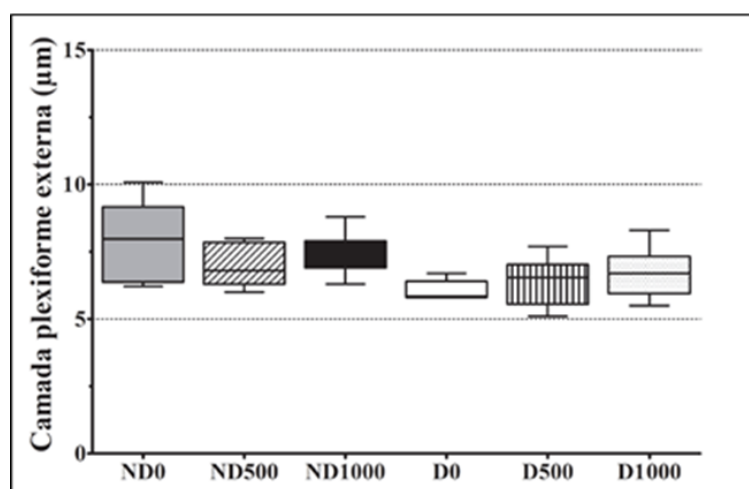


Figura 16. Médias e erro padrão relativos à espessura da camada plexiforme externa em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem suplementação), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil.

Na camada nuclear interna, as médias da espessura variaram e estão representadas na tabela 13. O grupo D0 apresentou diminuição significativa em comparação ao grupo ND0 ( $p < 0,05$ ) (Figura 17).

Tabela 13. Espessura da camada nuclear interna em pacus suplementados com camu-camu.

| Grupo  | Espessura ( $\mu\text{m}$ ) | Média                             |
|--------|-----------------------------|-----------------------------------|
| ND0    | 7,81 - 15,09                | $12,40 \pm 1,44 \mu\text{m}^a$    |
| ND500  | 7,57 - 12,37                | $9,16 \pm 0,73 \mu\text{m}^{ab}$  |
| ND1000 | 6,7 - 10,9                  | $9,41 \pm 0,58 \mu\text{m}^{ab}$  |
| D0     | 6,5 - 8                     | $7,42 \pm 0,24 \mu\text{m}^b$     |
| D500   | 6 - 15,6                    | $10,76 \pm 1,34 \mu\text{m}^{ab}$ |
| D1000  | 6,9 - 11,6                  | $9,6 \pm 0,81 \mu\text{m}^{ab}$   |

Médias seguidas de pelo menos por uma letra minúscula diferente indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

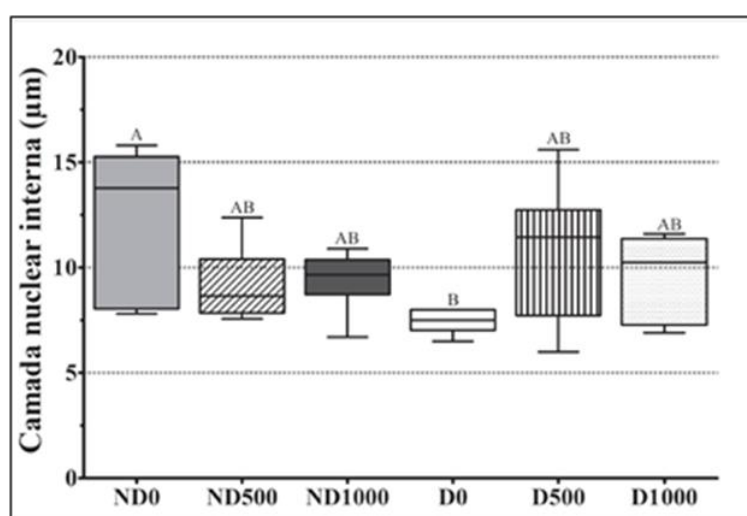


Figura 17. Médias e erro padrão relativos à espessura da camada nuclear interna em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem suplementação), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. \*Médias seguidas de pelo menos por uma letra maiúscula em comum não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Relativamente a camada plexiforme interna, as médias da espessura variaram e estão representadas na tabela 14. Diminuição significativa foi observada nos grupos ND500, D0, D500, quando comparada ao grupo ND0 ( $p = 0,0539$ ). O grupo ND500 demonstrou queda quando comparado aos grupos ND1000 e D1000. No grupo

ND1000 observou-se aumento significativo em relação ao grupo D0 e D500 ( $p=0,0539$ ) (Figura 18).

Tabela 14. Espessura da camada plexiforme interna em pacus suplementados com camu-camu.

| Grupo  | Espessura ( $\mu\text{m}$ ) | Média                          |
|--------|-----------------------------|--------------------------------|
| ND0    | 31,14 - 34,56               | $34,56 \pm 0,54 \mu\text{m}^a$ |
| ND500  | 23,94 - 30,57               | $26,59 \pm 1,13 \mu\text{m}^b$ |
| ND1000 | 31,5 - 36,72                | $31,5 \pm 0,77 \mu\text{m}^a$  |
| D0     | 20,09 - 29,69               | $20,09 \pm 1,90 \mu\text{m}^b$ |
| D500   | 16,43 - 25,26               | $20,60 \pm 1,60 \mu\text{m}^b$ |
| D1000  | 28,37 - 42,63               | $31,79 \pm 2,13 \mu\text{m}^a$ |

Médias seguidas de pelo menos por uma letra minúscula diferente indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ).

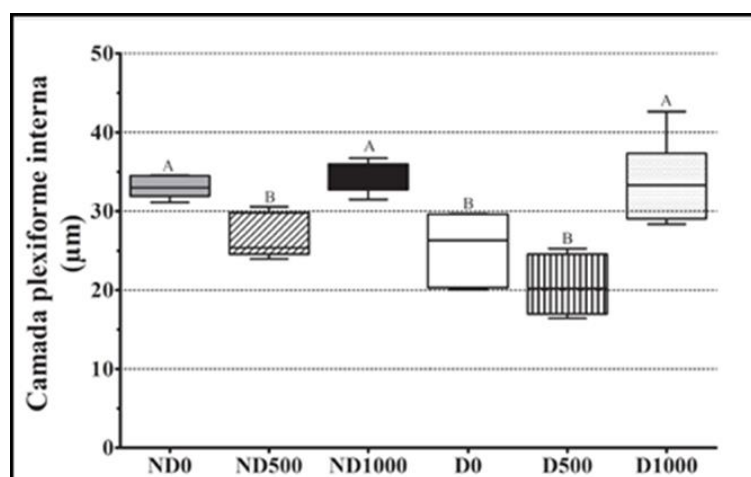


Figura 18. Médias e erro padrão relativos à espessura da camada plexiforme interna em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não diabéticos representados por: ND0 (controle), ND500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu), ND1000 (suplementado com 1000 mg /Kg de camu-camu) e diabéticos representados por: D0 (sem suplementação), D500 (suplementado com 500 mg /Kg de camu-camu) e D1000 (suplementado com 1000 mg/Kg de camu-camu). FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil. \*Médias seguidas de pelo menos por uma letra maiúscula diferente indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ).

### 3.3.2. Histopatologia

Após sete dias de tratamento, 43% do grupo D0 apresentou lesões que poderiam ser compatíveis com mineralização vascular. Predominantes vasos epiretinais colapsados, estreitos de menor calibre ou alongados e dilatados também foram observados. Presença de picnoses das células ganglionares foram identificados, bem como infiltrados perivasculares leves de linfócitos. Em contraste com o grupo D500, apresentou vasos epiretinais finos, menores ou colapsados e infiltrado estromal de linfócitos na íris. O grupo D1000 mostrou dos vasos epiretinais finos, menores ou colapsados. No grupo ND500 raros vasos epiretinais colapsados foram identificados, mas em 3 animais foram observados. No grupo ND1000 poucos vasos colapsados foram observados. As médias da quantificação dos vasos abertos, colapsados e estreitos apresentam-se na tabela 15.

Tabela 15. Quantificação de vasos abertos colapsados e estreitos em pacus suplementados com camu-camu.

| Grupo         | Vasos abertos | Vasos estreitos          | Vasos colapsados |
|---------------|---------------|--------------------------|------------------|
| <b>ND0</b>    | 16,21±1,56    | 5,11±4,42 <sup>a</sup>   | 4,37±2,85        |
| <b>ND500</b>  | 12,14±2,78    | 7,86±3,29 <sup>abc</sup> | 5,00±4,20        |
| <b>ND1000</b> | 16,08±5,85    | 6,08±4,21 <sup>ab</sup>  | 4,25±3,72        |
| <b>D0</b>     | 10,94±7,34    | 11,59±4,46 <sup>bc</sup> | 5,94±4,01        |
| <b>D500</b>   | 8,25±4,54     | 13,50±7,08 <sup>c</sup>  | 8,08±5,59        |
| <b>D1000</b>  | 13,30±6,33    | 8,10±5,07 <sup>abc</sup> | 5,20±4,02        |

Médias seguidas de pelo menos por uma letra minúscula em comum não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.3. IQ caspase-3, caspase-9 e Índice apoptótico

A expressão para a caspase-3 na camada nuclear interna (CNI) do grupo diabético teve tendência de maior pontuação de expressão final do escore ao se comparar com o grupo controle. O grupo tratado com 500mg de camu-camu ainda teve uma menor tendência na expressão final do score ao ser comparado com o grupo de diabético tratados com 1000mg (Figura 19). A camada nuclear externa (CNE) do grupo diabético também teve tendência de maior pontuação de expressão final do escore ao se comparar com o grupo controle. Os grupos diabéticos tratados mostraram tendência de menor escore versus o grupo diabético. O grupo diabético



tratado com 1000mg de camu-camu teve tendência de menor escore do que o grupo tratado 500mg de camu-camu ao comparar-se com o grupo controle (Figura 20) (Tabela 16). A imunohistoquímica para a caspase-9 nas camadas nuclear interna e externa do grupo diabético, revelou tendência de maior pontuação de expressão final do escore ao se comparar com o grupo controle. Os grupos diabéticos tratados tiveram tendência de um menor escore versus o grupo diabético, enquanto o grupo diabético tratado com 500mg de camu-camu, mostrou um escore igual ao grupo controle. Para a camada nuclear externa, os grupos diabéticos tratados mostraram um escore similar entre si e na mesma tendência do grupo controle (Tabela 17) (Figura 21 e figura 22).

A análise estatística revelou que o D0 não diferiu significativamente do índice apoptótico ao ser comparado com o ND0. Os outros grupos não apresentaram diferença estatística quando comparado com o grupo ND0, apresentando tendência de menor índice apoptótico em relação ao D0 (Figura 23).

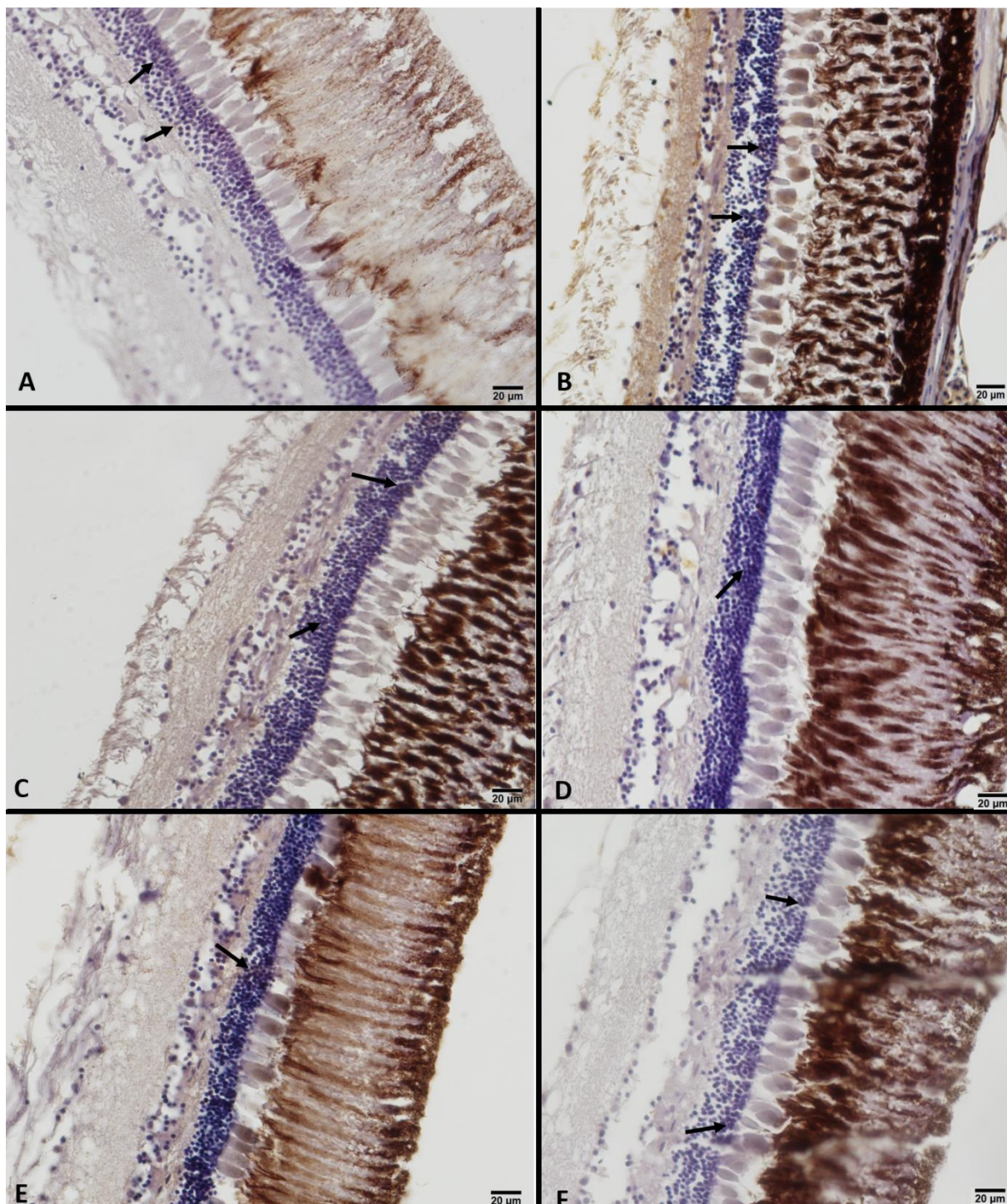


Figura 19. Caspase-3 CNE. (A) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (B) Escore final 4 (distribuição do escore 2, intensidade score 2); (C) Escore final 2 (distribuição do escore 1, intensidade score 2); (D) Escore final 2 (distribuição do escore 1, intensidade score 2); (E) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (F) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); DAB peroxidase contra coloração hematoxilina magnificação 40X.



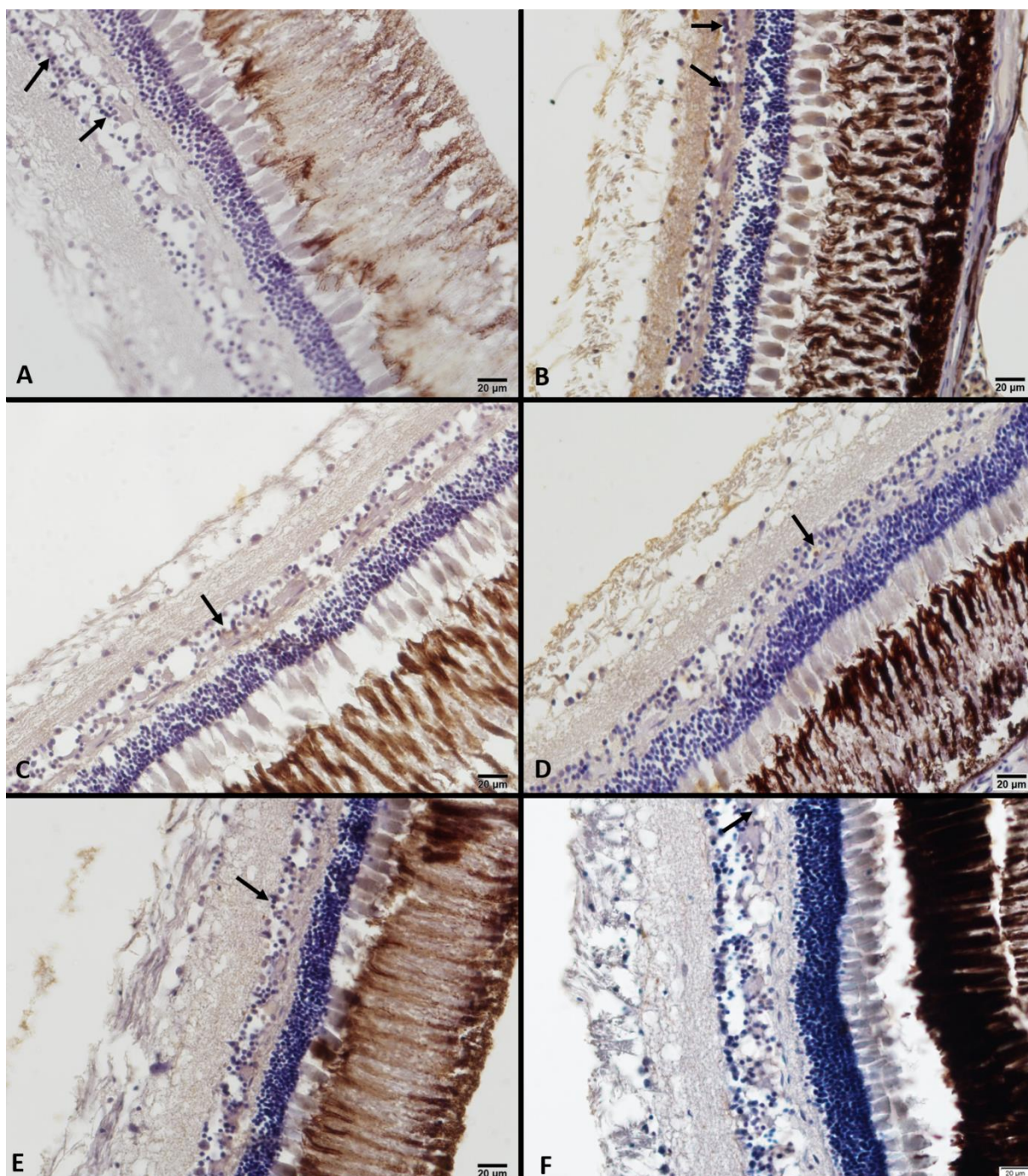


Figura 20. Caspase-3 CNI. (A) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (B) Escore final 6 (distribuição do escore 3, intensidade score 2); (C) Escore final 2 (distribuição do escore 1, intensidade score 2); (D) Escore final 2 (distribuição do escore 2, intensidade score 1); (E) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (F) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); DAB peroxidase contra coloração hematoxilina magnificação 40X.



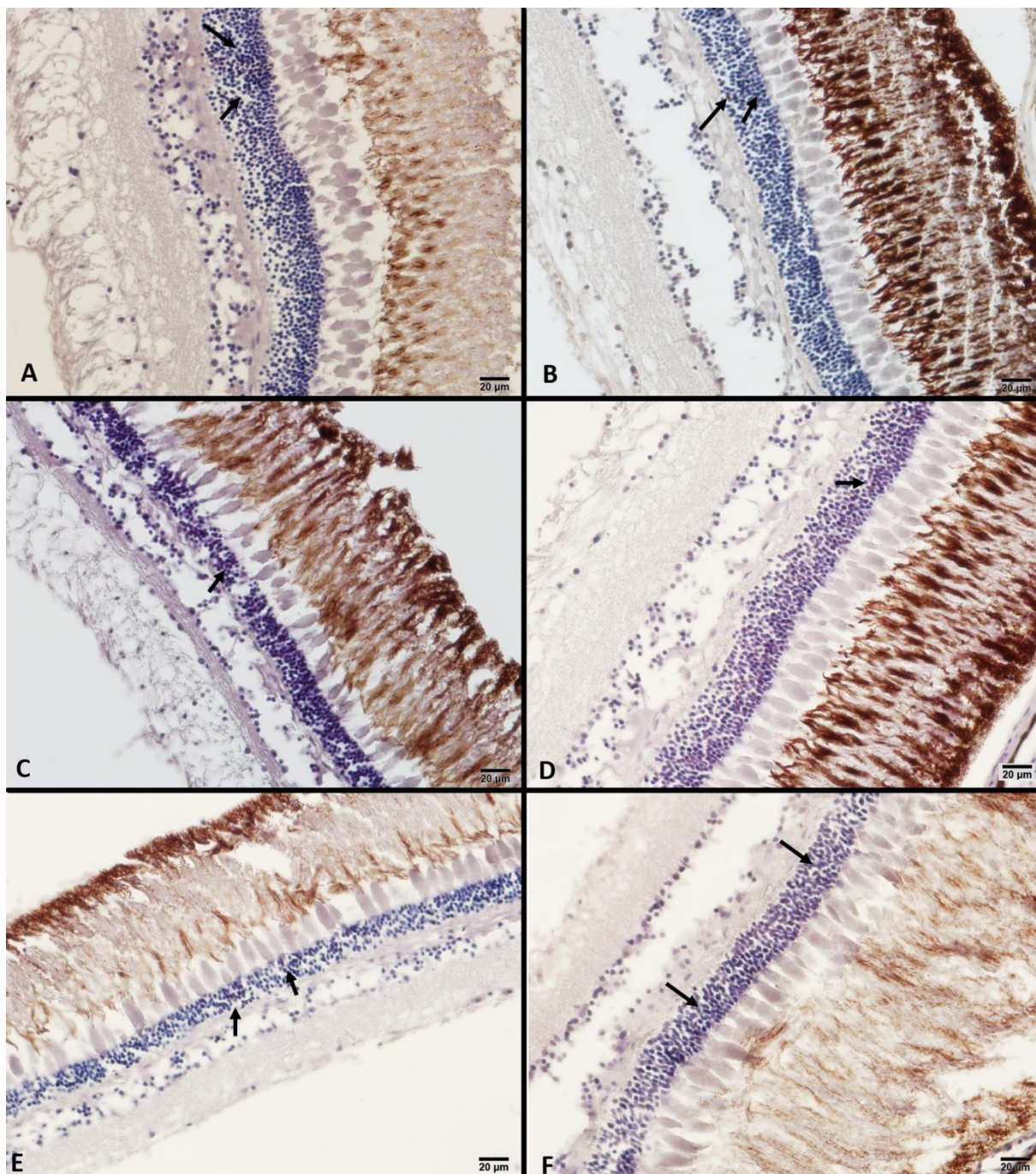


Figura 21. Caspase-9 CNE. (A) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (B) Escore final 2 (distribuição do escore 1, intensidade score 2); (C) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (D) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (E) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (F) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); DAB peroxidase contra coloração hematoxilina magnificação 40X.



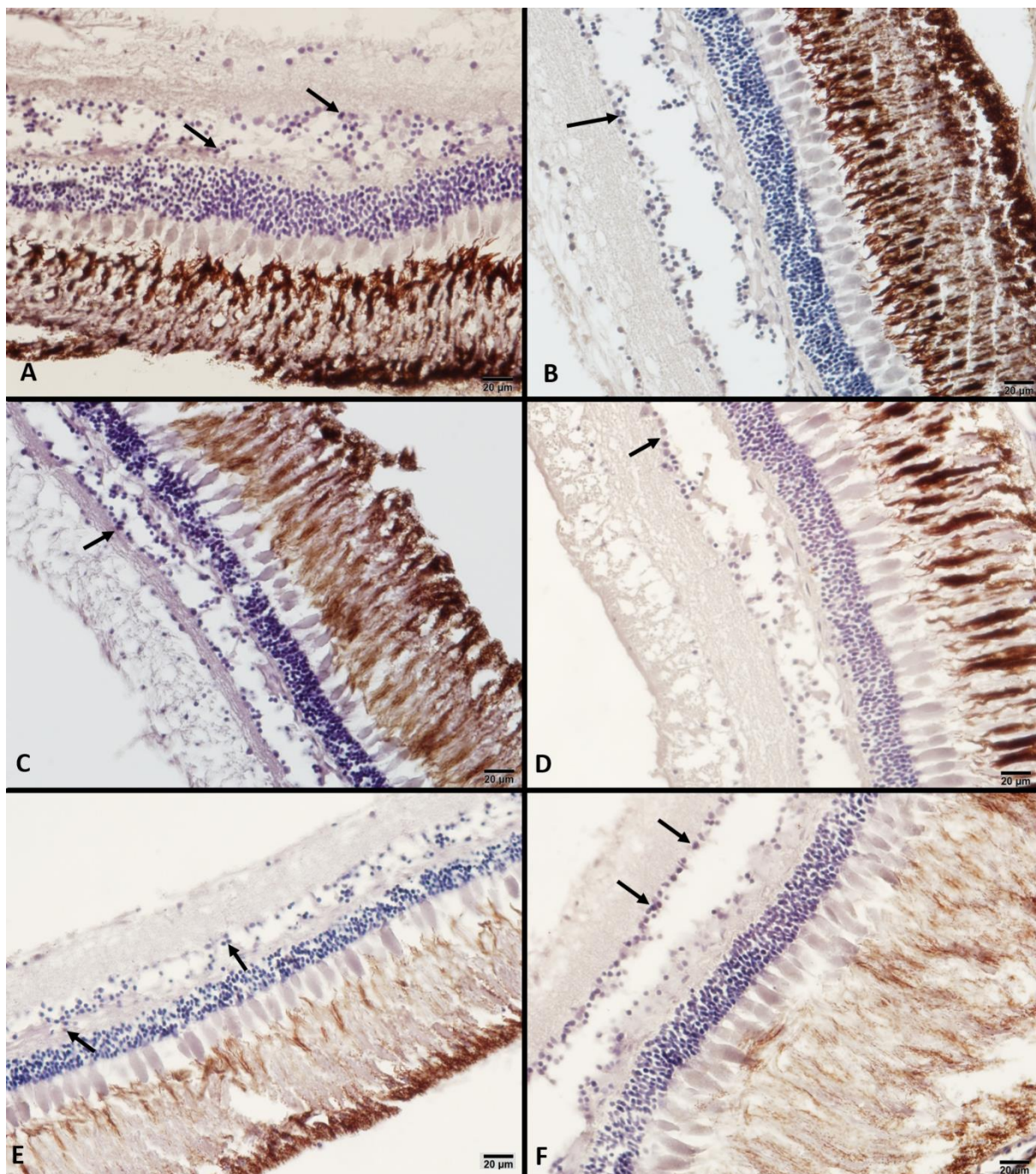


Figura 22. Caspase-9 CNI. (A) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (B) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (C) Escore final 2 (distribuição do escore 1, intensidade score 2); (D) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 2); (E) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); (F) Escore final 1 (distribuição do escore 1, intensidade score 1); DAB peroxidase contra coloração hematoxilina magnificação 40X.

Tabela. 16. Escore de imunoistoquímica nas camadas nuclear externa (CNE) e interna de retinas (CNI).

|               | Animal | CNE<br>apoptose | CNI<br>apoptose |
|---------------|--------|-----------------|-----------------|
| <b>N0</b>     | 1      | 1               | 2               |
|               | 2      | 2               | 2               |
|               | 3      | 1               | 1               |
|               | 4      | 1               | 1               |
|               | 5      | 1               | 1               |
|               | 6      | 1               | 1               |
| <b>ND500</b>  | 1      | 1               | 1               |
|               | 2      | 1               | 1               |
|               | 3      | 1               | 1               |
|               | 4      | 1               | 1               |
|               | 5      | 1               | 1               |
|               | 6      | 1               | 1               |
| <b>ND1000</b> | 1      | 1               | 1               |
|               | 2      | 1               | 1               |
|               | 3      | 1               | 1               |
|               | 4      | 1               | 1               |
|               | 5      | 1               | 1               |
|               | 6      | 1               | 1               |
| <b>D0</b>     | 1      | 6               | 1               |
|               | 2      | 2               | 2               |
|               | 3      | 1               | 4               |
|               | 4      | 6               | 2               |
|               | 5      | 1               | 2               |
|               | 6      | 2               | 1               |
| <b>D500</b>   | 1      | 1               | 2               |
|               | 2      | 1               | 1               |
|               | 3      | 2               | 1               |
|               | 4      | 2               | 1               |
|               | 5      | 1               | 1               |
|               | 6      | 1               | 1               |
| <b>D1000</b>  | 1      | 1               | 2               |
|               | 2      | 1               | 1               |
|               | 3      | 1               | 1               |
|               | 4      | 1               | 2               |
|               | 5      | 1               | 1               |
|               | 6      | 1               | 1               |

Apoptoses para caspase-3 nas camadas CNE: camada nuclear externa e CNI: camada nuclear interna, segundo análises semiquantitativo.

Tabela 17. Escore de imunoistoquímica nas camadas nuclear externa (CNE) e interna (CNI).

|               | Animal | CNE<br>apoptose | CNI<br>apoptose |
|---------------|--------|-----------------|-----------------|
| <b>N0</b>     | 1      | 2               | 1               |
|               | 2      | 1               | 1               |
|               | 3      | 1               | 1               |
|               | 4      | 1               | 1               |
|               | 5      | 1               | 1               |
|               | 6      | 1               | 1               |
| <b>ND500</b>  | 1      | 1               | 1               |
|               | 2      | 1               | 1               |
|               | 3      | 1               | 1               |
|               | 4      | 1               | 1               |
|               | 5      | 1               | 1               |
|               | 6      | 1               | 1               |
| <b>ND1000</b> | 1      | 1               | 1               |
|               | 2      | 1               | 1               |
|               | 3      | 1               | 1               |
|               | 4      | 1               | 1               |
|               | 5      | 1               | 1               |
|               | 6      | 1               | 1               |
| <b>D0</b>     | 1      | 1               | 2               |
|               | 2      | 1               | 2               |
|               | 3      | 1               | 1               |
|               | 4      | 1               | 2               |
|               | 5      | 2               | 3               |
|               | 6      | 2               | 1               |
| <b>D500</b>   | 1      | 1               | 1               |
|               | 2      | 1               | 1               |
|               | 3      | 1               | 1               |
|               | 4      | 1               | 1               |
|               | 5      | 1               | 1               |
|               | 6      | 1               | 1               |
| <b>D1000</b>  | 1      | 1               | 1               |
|               | 2      | 1               | 1               |
|               | 3      | 1               | 2               |
|               | 4      | 1               | 1               |
|               | 5      | 1               | 2               |
|               | 6      | 1               | 1               |

Apoptoses para caspase-9 nas camadas CNE: camada nuclear externa e CNI: camada nuclear interna, segundo análises semiquantitativo.

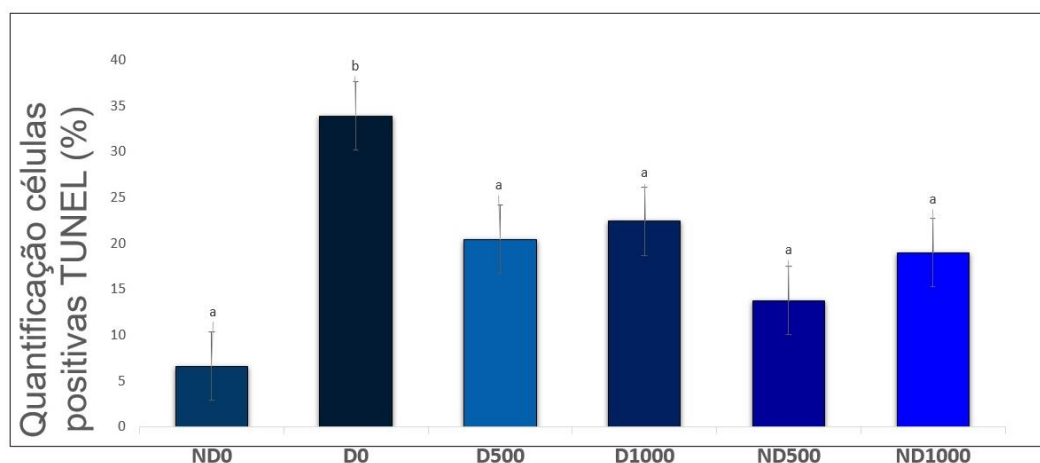


Figura 23. Índice apoptótico na retina. Observa-se o incremento significativo nos grupos D0, D500 e D1000 quando comparado com o grupo ND0. Medias e erro padrão seguidas por letras iguais diferentes indicam diferença significativa por teste Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Atualmente, pesquisas conduzidas em carpas e tilápias tem investigado os efeitos antioxidantes de diversos frutos e hortaliças (Lazzari et al., 2019; Adel et al., 2015; Acar, 2018; Brum, et al., 2017; Abdollahzadeh, et al., 2014; Ebrahimi et al., 2020; Abdel-Latif et al., 2020). Outros estudos confirmaram que suplementação de antioxidantes na dieta pode viabilizar novas terapias de prevenção e tratamento nas retinopatias (Hernandez et al., 2016; Li et al., 2016). Berrow et al., (2016) aplicaram a suplementação de Luteína como antioxidante em humanos saudáveis durante 40 semanas, demonstrando melhora no ERG multifocal. Já em Beagles, Wang et al. (2016), apresentaram melhoras na função escotópica e fotópica, após a suplementação de um complexo de antioxidantes durante seis meses.

Em pacientes diabéticos, as células retinianas estão expostas a um elevado quantitativo de radicais livres (Alvarez et al., 2010; Gleeson et al., 2007), tal qual é capaz de exaurir seus mecanismos antioxidativos compensatórios (West, 2000). Foi

evidenciado mediante análises de ondas eletrorretinográficas alterações precoces em estágios iniciais em RD, observando menor amplitude e maior tempo implícito das ondas a e b do Flicker em pacientes humanos (Pescosolido, et al., 2015; Fukuo et al., 2016). Dados similares em ondas eletrorretinográficas foram encontrados por Alvarez et al., (2010), em larvas de *Zebrafish* (*Danio rerio*) diabéticas induzidas durante 30 dias. Nesta pesquisa, foi implementada técnica eletrorretinográfica descrita pelos autores que permitiram caracterizar parâmetros eletrorretinográficos preditivos de RD no pacu.

Estudos relativos à implementação de antioxidantes em RD, mostraram seus benefícios para a prevenção da doença nos estágios iniciais (Zeng et al., 2015). No presente estudo a análise de ondas eletrorretinográficas demonstraram diferença estatística de maior amplitude da onda **a** dos bastonetes, nos grupos D0 e D1000 quando comparado com o grupo ND0. Em relação à onda mista, também se constatou aumento significativo das amplitudes da onda **a** entre o grupo D0 quando comparado com o ND0. Nossos resultados revelam valores altos, possivelmente porque não se atinge por completo a capacidade de condução dos fotorreceptores, que afetaria a sequência de transmissão do estímulo elétrico. Concordando com os resultados realizados em camundongos diabéticos por oito, dezesseis e vinte quatro semanas, demonstraram a onda **a** incrementada (Bogdanov et al., 2004). Em outros trabalhos de fases tardias de retinopatia diabética, a onda **a** apresenta-se diminuída na fase escotópica (Li et al., 2002; Okuno et al; 2008). Pois o diabetes afeta a atividade do potencial de membrana ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -adenosina 5'-trifosfatase) (Wetzel; 1999), que é localizada nos segmentos externos dos fotorreceptores, e que tem um papel fundamental na manutenção da onda **a** (Ottlecz et al; 1993). Portanto, não se tem um consenso sobre a atividade da onda **a** no diabetes.

Kowluru et al., (2014), demonstraram ondas **a** e **b** menos afetadas, em ratos Wistar diabéticos suplementados com carotenoides durante quatro meses. O mesmo foi encontrado por Zeng et al. (2015) na suplementação com Resveratrol durante sete meses, em ratas diabéticas, atenuando a diminuição da amplitude da onda **a** dos bastonetes e a onda **b** dos bastonetes e cones. Neste estudo, respostas similares foram encontradas, observando o tempo implícito mais rápido no grupo D500 quando comparados com os grupos D0 e ND500, podendo esta resposta estar relacionada



diretamente com a capacidade antioxidante do camu-camu, outrossim, não observado os mesmos benefícios quanto à suplementação em concentrações mais altas (1000mg). As altas quantidades de vitamina C na retina, podem ter gerado saturação, ocasionando tal fato.

As lesões que se manifestam na RDNP, já foram classificadas em humanos com base na tortuosidade dos vasos retiniais (Mustafa et al., 2015), ou presença de alterações vasculares (Vallabha et al., 2004; Viswanath et al., 2003; Wu et al., 2013). Tais lesões se classificam como: leve e moderado, quando se observaram microaneurismas em diversos graus. As classificadas como severas, notam-se hemorragias, vênulas em formato de rosário e IRMAS em mais de um quadrante. Na literatura não há classificação de avaliação das retinopatias induzidas em peixes, o que nos levou a adaptar uma classificação junto ao escore clínico. O DM produziu lesões severas na retina, manifestando-se como perda de vascularização (presença de IRMAS) e atrofia total no grupo D0 (escore 3), apresentando diferença significativa com o grupo D1000 (escore 2,83), o que evidencia o dano presente na retina. A suplementação com camu-camu diminuiu as lesões produzidas na retina, mas os animais D500 foram menos afetados ao manifestarem escore menor do que os D1000. Provavelmente, a dose mais baixa funcionou de maneira mais eficiente, porque são requeridas concentrações específicas de ácido ascórbico (principal componente do camu-camu), que está relacionado com a ação sobre o endotélio vascular (quem o distribui no corpo) e manter a regulação de apoptoses e o controle da proliferação endotelial (May e Harryson 2013). Em concentrações altas, o ácido ascórbico é capaz de inibir a angiogênese (Mirikowa et al., 2010), por reduzir a atividade celular metabólica endotelial e os níveis de ATP (Saghiri et al., 2017). Ademais, altas concentrações de ácido ascórbico podem também estar relacionado com menor preservação do endotélio vascular.

Nesta pesquisa, o diabetes induzido pela aloxana fez com que as camadas da retina após sete dias de hiperglicemia (glicose 159 mg/dL), tivessem menor espessura, comparando-se com aquelas de peixes não diabéticos. Diferente do encontrado em outros protocolos onde após várias semanas ou meses ocorrerem mudanças nessa estrutura ocular (Glesson, 2007). Nosso protocolo demonstrou que todos os peixes se tornaram diabéticos e suas retinas foram afetadas desde os

estágios iniciais. RDs em pacientes humanos são observadas com alterações iniciais na porção anterior da retina (Rui et al., 2018). Neste estudo as alterações observadas nos estágios iniciais ocorreram apenas na porção posterior. Contudo, observou-se diminuição geral na espessura da retina em pacus induzidos a diabetes.

Relativamente, alterações nas camadas da retina foi observado uma diminuição das camadas dos fotorreceptores, nuclear externa, nuclear interna e a plexiforme interna, podendo evidenciar neurodegeneração como eventos precoces de RD relacionado com o déficit funcional. Estudos conduzidos em *Zebrafish* e no *Devario aequipinnatus* com DM induzida também demonstraram diminuição nessas duas últimas camadas (Gleeson et al., 2007; Raja et al., 2015). Pesquisas futuras com enfoque nas alterações histomorfométricas em peixes com DM são necessárias para se estabelecer se há um padrão ou se há um mecanismo compensatório que leva a não manifestação da redução da espessura retiniana.

No *Zebrafish*, a camada do epitélio pigmentar e do segmento externo dos fotorreceptores são interdependentes. Tais camadas são associadas firmemente através das microvilosidades da parte apical do epitélio, a similitude do que ocorre com outros vertebrados (Hodel et al., 2006). No pacu, o epitélio pigmentar representa um terço da espessura total da retina. Em condições de hiperglicemia é alterada a concentração da bomba  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ , diminuindo a permeabilidade do epitélio pigmentar, o que poderia alterar o transporte de água, retinol e ácido ascórbico, desde o espaço sub-retiniano aos capilares da coroide, limitando assim a resposta ao estresse oxidativo (Salceda e Contreras 2007; Thebault, 2011).

O grupo D0 apresentou diminuição na camada do epitélio pigmentar quando comparado com todos os grupos, sendo estatisticamente significativo com o grupo ND500. Observando que ao ser suplementados inclusive quando diabéticos apresentaram um efeito benéfico na proteção do epitélio pigmentar. A alteração do epitélio pigmentar pode afetar diretamente a sobrevivência dos fotorreceptores podendo levar ao acúmulo de toxinas no epitélio pigmentar, produzindo sua degeneração (Yamada et al., 2001).

Relativamente a camada dos fotorreceptores (segmentos externos e internos dos bastonetes e cones), a camada nuclear interna e nuclear externa unicamente observou-se alterada no grupo D0 observando se diminuição relevante. Nos outros

grupos inclusive diabéticos tratados não observou tal alteração. A camada nuclear interna contém os núcleos das células bipolares que fazem sinapses com os fotorreceptores, células horizontais e células ganglionares; amácrinas, interplexiformes e de Muller. Após a captação do sinal por parte dos fotorreceptores, este é conduzido às células bipolares e elas transmitem para as células ganglionares e a camada nuclear externa é conformada pelos núcleos dos fotorreceptores. Nesse contexto, o camu-camu manteve a integridade das células envolvidas na transmissão após a captação do sinal. Suas propriedades antioxidativas atuam contra os radicais livres (Fidelis et al., 2018), reduzindo o estresse oxidativo relacionado às condições de hiperglicemia (De Souza et al., 2014). Além disso, o camu-camu contém inibidores de aldose redutase, cuja atividade é importante na patogênese do diabetes (Ueda et al., 2004). Estudos são necessários sobre o papel antioxidante deste agente e sua influência direta nos mecanismos fisiológicos dos fotorreceptores, células amácrinas, bipolares e Müller que são danificados frequentemente na RD.

A camada plexiforme interna é onde acontecem as sinapses com múltiplas terminações celulares em forma de redes. Foi evidenciado no presente estudo, diminuição significativa no grupo D0 junto à camada nuclear externa. Já no grupo D1000, observou-se um incremento dessa camada. Similares resultados foram já descritos por Ling et al. (2020).

Portanto, a capacidade antioxidante apoia a nossa hipótese do efeito do camu-camu sobre a retina, corroborando que os benefícios dos antioxidantes fomentam proteção em pacientes diabéticos desde as fases iniciais.

Na RD, a vascularização epiretinal é afetada pelo estresse oxidativo conduzindo anormalidades vasculares, descritas como a diminuição dos diâmetros arteriolares (Wright et al., 2009; Shen et al., 2006; Vessey et al., 2011) e o estreitamento arteriolar na retina (Cheung et al., 2015). Comparativamente com o grupo ND0, os peixes do grupo D0 apresentavam vasos abertos em menor quantidade e vasos estreitos em maior quantidade. E quando são suplementados na maior dose (1000mg), são similares ao grupo ND0. Suspeitamos que a ação do camu-camu sobre a preservação da morfologia dos vasos epiretinais é dose dependente. Também, seu efeito benéfico em indivíduos saudáveis com histórico de diabetes, pressão alta e dislipidemia demonstram melhoras na função endotelial e pressão sanguínea

(Miyashita et al., 2018). Portanto, estudos no fluxo sanguíneo coroidal devem ser aprofundados para demonstrar a relação direta no olho.

Lesões retinianas oriundas do estresse oxidativo no diabetes produzida pelo DM acarreta perda de neurônios devido a um aumento de apoptose (Zhang et al; 2018). Corroborando com nossos estudos o grupo D0, apresentou índice apoptótico significativamente mais alto quando comparado com o grupo ND0. Nos grupos diabéticos com tratamento não foi observado mudança significativa, ainda apresentando índice apoptótico mais alto do que o grupo ND0 evidenciando benefícios na dieta quanto a suplementação com camu-camu, com possível efeito antiapoptótico.

A atividade da caspase-9 forma parte do complexo apoptótico no citosol, sendo a responsável pela ativação da caspase-3 (Gao et al., 2018). A caspase-3 é a principal protease envolvida em eventos de apoptose. A enzima é responsável pela ativar as endonucleases, assim como pela quebra de proteínas estruturais citoplasmáticas (Zhang, 2017). Relativamente ao escore da imunomarcação com caspase-3 e -9, nosso estudo evidenciou um possível efeito antiapoptótico na retina de pacus DM, suplementados com camu-camu. Houve um aumento no escore para as caspase-3 e caspase-9, em camadas nuclear interna e nuclear externa no grupo D0, em comparação com o grupo ND0. Quando foram suplementados, o apresentaram menor tendência no escore, sugerindo que a apoptoses diminuíram e foi mais efetiva ao se utilizarem doses mais baixas.

## 5. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos e segundo as condições de como a pesquisa foi desenvolvida, há como admitir que a suplementação com camu-camu (*Myrciaria dúbia*), apresenta efeito neuroprotetor na retina em pacus diabéticos. Ademais, constatou-se que a suplementação de 500 mg/kg de camu-camu foi mais eficiente que doses mais elevadas.

## Declaração de interesse

Nenhum.

## 6. REFERÊNCIAS

Abdel-Latif, H.M.R., Abdel-Tawwab, M., Khafaga, A.F., Dawood, M.A.O., 2020. Dietary Origanum essential oil improved antioxidative status, immune-related genes, and resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish Shellfish Immunol* 104, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.056>

Acar, U., 2018. Effects of diet supplemented with ethanolic extract of propolis on growth performance, hematological and serum biochemical parameters and disease resistance of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) against *Streptococcus iniae*, *Aquaculture* 495, 339-344. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.007>

Adel, M., Abedian, Amiri, A., Zorriehzahra, J., Nematollahi, A., Esteban, M.Á., 2015. Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). *Fish Shellfish Immunol* 45, 841-7. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.06.010>

Bek, T., 2014. Fine structure in diabetic retinopathy lesions as observed by adaptive optics imaging. A qualitative study. *Acta Ophthalmol* 92, 753-758. <https://doi.org/10.1111/aos.12464>

Berrow, E.J., Bartlett, H.E., Eperjesi, F., 2016. The effect of nutritional supplementation on the multifocal electroretinogram in healthy eyes. *Doc Ophthalmol* 132,123-35. <https://doi.org/10.1007/s10633-016-9532-3>

Bogdanov, P., Corraliza, L., Villena, J. A., Carvalho, A. R., Garcia-Arumí, J., Ramos, D., Ruberte, J., Simó, R., & Hernández, C. (2014). The db/db mouse: a useful model

for the study of diabetic retinal neurodegeneration. PloS One 9, e97302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097302>

Brum, A., Pereira, S.A., Owatari, M.S., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Mourinho, J.L.P., Matins, M.L., 2007. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae* Aquaculture 468,235-243. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.020>

Burkhard, D.A., 1965. The goldfish electroretinogram: relation between photopic spectral sensitivity functions and cone absorption spectra. Vision Res 5, 517-53c1.

Campos, F.M., Ribeiro, S.M.R., Ceres D.L.L.M., Pinheiro-Santana H.M., 2009. Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. Quim. Nova 32, 87-91. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100017>

Carter-dawson, L.D., Lavail, M.M., 1979. Rods and Cones in the Mouse Retina structural analysis using light and electron microscopy louvenia. J. Comp. Neurol 188, 245-262. <https://doi.org/10.1002/cne.901880204>

Cheung, C.Y., Ikram, M.K., Klein, R. et al. 2015. The clinical implications of recent studies on the structure and function of the retinal microvasculature in diabetes. Diabetologia 58, 871-885. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3511-1>

Chua, J., Chia, A.R., Chee, M.L., Man, R.E.K., Tan, G.S.W., Lamoureux, E.L., Wong, T.Y., Chong, M.F.F., Schmetterer, L., 2018. The relationship of dietary fish intake to diabetic retinopathy and retinal vascular caliber in patients with type 2 diabetes. Sci. Rep 8, 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18930-6>

Cueva-Quiroz, V.A., Yunis-Aguinaga, J., Ramos-Espinoza, F., Claudiano, G.S., Marinho-Neto, F.A., Abreu, S.A., Moraes, F.R, Moraes, J.R.E. 2017. Protocolo para indução de diabetes com aloxana em pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: XII Reunião Científica do Instituto de Pesca, 2017, São Paulo. Anais da XII Reunião Científica do Instituto de Pesca.

DeMarco, P.J., Powers, M.K., 1989. Sensitivity of ERG components from dark-adapted goldfish retinas treated with APB. *Brain Res* 482, 317-323. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91194-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91194-3)

De Souza, Schmidt Gonçalves, A.E., Lellis-Santos, C., Curi, R., Lajolo, F.M., Genovese, M. I., 2014. Frozen pulp extracts of camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh) attenuate the hyperlipidemia and lipid peroxidation of Type 1 diabetic rats. *Food Res Int* 64, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.074>

Ebrahimi, E., Haghighi, M., Nematollahi, A., Goudarzian, F., 2020. Effects of rosemary essential oil on growth performance and hematological parameters of young great sturgeon (*Huso huso*). *Aquaculture* 521,1-6. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734909>

Emidio, E.C., Cunha-santos, Viganó, J., Neves, D.A., Martínez, J., Teixeira, H., 2018. Vitamin C in camu-camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh]: evaluation of extraction and analytical methods. *Food Res. Int. J* 115, 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.031>

Ezra-Elia, R., Alegro da Silva, G., Zanoni, D. S., Laufer-Amorim, R., Vitor Couto do Amaral, A., Laus, J. L., Ofri, R., 2017. Functional and Structural Evaluation of Sildenafil in a Rat Model of Acute Retinal Ischemia/Reperfusion Injury. *Current eye research* 42,452-461. <https://doi.org/10.1080/02713683.2016.1193615>

Falzett, M., Nussdorf, J.D., Powers, M.K., 1988. Responsivity and absolute sensitivity of retinal ganglion cells in goldfish of different sizes, when measured under “psychophysical” conditions. *Vision Res* 28, 223-237. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(88\)90149-6](https://doi.org/10.1016/0042-6989(88)90149-6)

Fidelis, M., de Oliveira, S.M., Sousa Santos, J., Bragueto Escher, G., Silva Rocha R, Gomes Cruz A, Araújo Vieira do Carmo M, Azevedo L, Kaneshima T, Oh WY, Shahidi F, Granato D. From byproduct to a functional ingredient: Camu-camu (*Myrciaria dubia*) seed extract as an antioxidant agent in a yogurt model. *J Dairy Sci* 2020,1131-1140. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17173>

Fukuo, M., Kondo, M., Hirose, A., Fukushima, H., Ikesugi, K., Sugimoto, M., Kato, K., Uchigata, Y., Kitano, S., 2016. Screening for diabetic retinopathy using new mydriasis-free, full-field flicker ERG recording device. *Sci Rep* 8,36591. <https://doi.org/10.1038/srep36591>

Gao, X., Zheng, Y., Ruan, X., Ji, H., Peng, L., Guo, D., Jiang, S., 2018. Salinomycin induces primary chicken cardiomyocytes death via mitochondria mediated apoptosis. *Chem Biol Interact* 282,45-54. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.01.009>

Gustavsen, K.A., Paul-Murphy, J.R., Weber, E.S., Zwingenberger, A.L., Dunker, F.H., Dubielzig, R.R., Reilly, C.M., Murphy, C.J., 2018. Ocular anatomy of the black pacu (*Colossoma macropomum*): gross, histologic, and diagnostic imaging. *Vet. Ophthalmol* 21, 507-515. <https://doi.org/10.1111/vop.12539>

Hernández, C., Dal Monte, M., Simó, R., & Casini, G. 2016. Neuroprotection as a Therapeutic Target for Diabetic Retinopathy. *Journal of diabetes research* 2016, 9508541. <https://doi.org/10.1155/2016/9508541>

Jefferson Yunis-Aguinaga, Dayanne C. Fernandes, Silas F. Eto, Paulo F. Marcusso, Fausto A. Marinho-Neto, João B.K. Fernandes, Flávio R. de Moraes, J.R.E. de M., 2016. Dietary camu-camu, *Myrciaria dubia*, enhances immunological response in Nile tilapia. *Fish Shellfish Immunol* 58, 284-291. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.030>

Jiang, X., Yang, L., Luo, Y., 2013. Animal Models of Diabetic Retinopathy. *Curr. Eye Res* 40, 1-23. <https://doi.org/10.3109/02713683.2014.964415>

Kowluru, R.A., Zhong, Q., Santos, J.M. et al. Beneficial effects of the nutritional supplements on the development of diabetic retinopathy. *Nutr Metab (Lond)* **11**, 8 (2014). <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-8>

Lazzari, R., Uczay, J., Henriques, J.K.S., Durigon, E.G., Kunz, D.F., Peixoto, N.C., & Fronza, D. 2019. Growth and digestive enzymes of silver catfish fed diets containing fruit residue. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 71,323-330. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10343>



Li, L., Li, Y., Zhou, Y., Ge, Z., Wang, L., Li, Z., Guo, Y., Jin, L., Ren, Y., Liu, J., Xu, Y., 2016. Jiangtang Xiaozhi Recipe (降糖消脂方) prevents diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. Chinese Journal of Integrative Medicine 23, 425-432. <https://doi.org/10.1007/s11655-016-2595-x>

Li, Q., Zemel, E., Miller, B., Perlman, I. 2002. Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations. Experimental eye research 74, 615-625. <https://doi.org/10.1006/exer.2002.1170>

Lin, Z.S., Yazulla, S., 1994. Depletion of retinal dopamine does not affect the ERG &-wave increment threshold function in goldfish in vivo. Vis. Neurosc 11, 695-702. <https://doi.org/10.1017/S095252380000300X>

May, J.M., Harrison, F.E., 2013. Role of vitamin C in the function of the vascular endothelium. Antioxid Redox Signal 19, 2068-83. doi: <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5205>

Mensingher, A.F., Powers, M.K., 1999. Visual function in regenerating teleost retina following surgical lesioning. Vis. Neurosci 16,241-251. <https://doi.org/10.1017/S0952523807070265>

Mikrova, N.A., Casciari, J.J., Riordan, N.H., 2010 Ascorbate inhibition of angiogenesis in aortic rings ex vivo and subcutaneous Matrigel plugs in vivo. J Angiogenes Res 2,2. <https://doi.org/10.1186/2040-2384-2-2>

Miyashita, T., Koizumi, R., Myoda, T., Sagane, Y., Niwa, K., Watanabe, T., Minami, K., 2017. Data on a single oral dose of camu-camu (Myrciaria dubia) pericarp extract on flow-mediated vasodilation and blood pressure in young adult humans. Data Brief 16, 993-999. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.12.009>

Mustafa, N.B.A., Zaki, W.M.D.W., Hussain, A., 2015. A review on the diabetic retinopathy assessment based on retinal vascular tortuosity. Proc. - 2015 IEEE 11th Int. Colloq. Signal Process. Its Appl. CSPA 2015,127-130. <https://doi.org/10.1109/CSPA.2015.7225631>

Nascimento, V.O., Boleti, P.A., A., Yuyama, K.O., Lima, L.E.S., 2013. Effects of diet supplementation with Camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK McVaugh) fruit in a rat model of diet-induced obesity. *An. Acad. Bras. Cienc* 85, 355-363. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652013005000001>

Neiffer, D.L., Stamper, M.A., 2009. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: Considerations, methods, and types of drugs. *ILAR J* 50, 343-360. <https://doi.org/10.1093/ilar.50.4.343>

Neves, L.C., Silva, V.X. Da Pontis, J.A., Flach, A., Sergio Ruffo Roberto, 2015. Bioactive compounds and antioxidant activity in pre-harvest camu-camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh] fruits. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 186, 223-229. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.031>

Niaz, K., Maqbool, F., Khan, F., Hassan, F.I., Momtaz, S., Abdollahi, M., 2018. Comparative occurrence of diabetes in canine, feline, and few wild animals and their association with pancreatic diseases and ketoacidosis with therapeutic approach. *Vet. World* 11, 410 - 422. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.410-422>

Okuno, T., Oku, H., Sugiyama, T., Ikeda, T., 2008. Electroretinographic study of spontaneously diabetic Torii rats. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology* 117, 191-196. <https://doi.org/10.1007/s10633-008-9122-0>

Ottlecz, A., Garcia, C. A., Eichberg, J., Fox, D. A., 1993. Alterations in retinal Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase in diabetes: streptozotocin-induced and Zucker diabetic fatty rats. *Current eye research* 12, 1111-1121. <https://doi.org/10.3109/02713689309033509>

Pescosolido N., Barbato A., Buomprisco G., 2015. Role of Electrophysiology in the Early Diagnosis and Follow-Up of Diabetic Retinopathy, *Journal of Diabetes Research* 2015, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/319692>

Raja, M., Kavitha, M., Ramkumar, R., A.M. P.P., 2015. The “Giant Danio” (*Devario aequipinnatus*)-Another Model for Diabetic Retinopathy Study: Induction of Hyperglycemia and Resultant Retinal Impairments. *Endocrinol. Diabetes Res* 01, 1-6. <https://doi.org/10.4172/2470-7570.1000108>

Rossino, M.G., Monte, M.D., Giovanni Casini, 2019. Relationships Between Neurodegeneration and Vascular Damage in Diabetic Retinopathy. *Front. Neurosci* 13, 1-20. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01172>

Rui Shi, Zhonglan Guo, Feng Wang, Rong Li, Lei Zhao, R.L.T., 2018. Alterations in retinal nerve fiber layer thickness in early stages of diabetic retinopathy and potential risk factors. *Curr. Eye Res.* ISSN 43, 244-253. <https://doi.org/10.1080/02713683.2017.1387669>

Rushton, K.I.N.A.W.A.H., 1966. S-potentials from colour units in the retina of fish (cyprinidae). *J. Physiol* 185, 536-555. [10.1113/jphysiol.1966.sp008001](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1966.sp008001)

Saghiri, M.A., Asatourian, A., Ershadifard, S., Moghadam, M.M., Sheibani, N., 2017. Vitamins and regulation of angiogenesis (B1, B2, B3, B9, B12, C, D, E, K,) *Journal of Functional foods* 38,180 -186. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.005>

Schmid, H., Renner, M., Dick, H.B., Joachim, S.C., 2014. Loss of inner retinal neurons after retinal ischemia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55, 2777-2787.

Shen, W.Y., Lai, C.M., Graham, C.E., Binz, N., Lai, Y.K., Eade, J., Guidolin, D., Ribatti, D., Dunlop, S.A., Rakoczy, P.E., 2006. Long-term global retinal microvascular changes in a transgenic vascular endothelial growth factor mouse model. *Diabetologia*. 49,1690-701. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0274-8>

Smid, J., Kalousova, M., Manda, B., Hous, J., Chla, A., Pinedo, M., Lojka, B., 2017. Morphological and genetic diversity of camu- camu [*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh] in the Peruvian Amazon~ ml. *PLoS One* 12, 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179886>

Stetter, M.D., 2001. Fish and amphibian anesthesia. *Vet. Clin. NORTH Am. Exot. Anim Pract* 4, 69-82.

Sarangi, S., Mohapatra. A., Sabut, K.S., 2015. A comparative evaluation of diabetic retinal vascular structures using edge detection techniques. *Int. J. Telemed. Clin. Pract* 1, 111-120. <https://doi.org/10.1504/ijtmcp.2015.069476>

Toro, M.D., Nowomiejska, K., Avitabile, T., Rejdak, R., Tripodi, S., Porta, A., Reibaldi, M., Figus, M., Posarelli, C., Fiedorowicz, M., 2019. Effect of Resveratrol on In Vitro and In Vivo Models of Diabetic Retinopathy: A Systematic Review. *Int J Mol Sci* 20,2-16. <https://doi.org/10.3390/ijms20143503>

Ueda, H., Kuroiwa, E., Tachibana, Y., Kawanishi, K., Ayala, F., Moriyasu, M., 2004. Aldose reductase inhibitors from the leaves of *Myrciaria dubia* (H. B. & K.) McVaugh. *Phytomedicine* 11, 652-656. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.12.002>

Vallabha, D., Dorairaj, R., Namuduri, K., Thompson, H., 2004. Automated detection and classification of vascular abnormalities in diabetic retinopathy. *Conf. Rec. - Asilomar Conf. Signals, Syst. Comput* 2,1625-1629. <https://doi.org/10.1109/acssc.2004.1399432>

Viswanath, K., McGavin, D.D.M., 2003. Diabetic Retinopathy: Clinical Findings and Management. *Community Eye Heal* 16, 21-24.

Wang, W., Hernandez, J., Moore, C., Jackson, J., Narfström, K., 2016. Antioxidant supplementation increases retinal responses and decreases refractive error changes in dogs. *J. Nutr Sci* 5, 1-7. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.5>

Wang, Y., Chen, S., Yu, O., 2011. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 91, 949-956. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3449-2>

Wetzel, R.K., Arystarkhova, E., Sweadner, K.J. 1999. Cellular and subcellular specification of Na,K-ATPase alpha and beta isoforms in the postnatal development of mouse retina. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 9878-9889. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-22-9878.1999>

Witt, N., Wong, T.Y., D.Hughes, A., Chaturvedi, N., EKlein, B., Evans, R., McNamara, M., Thom, S.A.M., Ronald Klein, 2006. Abnormalities of retinal microvascular structure and risk of mortality from ischemic heart disease and stroke. *Hypertension* 47, 975-981. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000216717.72048.6c>

Wright, W.S., Messina, J.E., Harris, N.R., 2009. Attenuation of diabetes-induced retinal vasoconstriction by a thromboxane receptor antagonist. *Exp Eye Res* 88, 106-12. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.10.008>

Wu, L., Fernandez-Loaiza, P., Sauma, J., Hernandez-Bogantes, E., Masis, M., 2013. Classification of diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *World journal of diabetes* 4, 290-294. <https://doi.org/10.4239/wjd.v4.i6.290>

Wu, X., Cheng, B., Cai, Z.D., Lou, L.M., 2013. Determination of the apoptotic index in osteosarcoma tissue and its relationship with patient's prognosis. *Cancer Cell Int* 13, 2-4. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-56>

Xu, B.Y., Morrison, C.M., Yang, H., Wright, J.R., 2004. Tilapia islet grafts are highly alloxan-resistant. *Gen. Comp. Endocrinol* 137, 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.02.017>

Yunis-Aguinaga, J., Claudiano, G.S., Marcusso, P.F., Manrique, W.G., de Moraes, J.R.E., de Moraes, F.R., Fernandes, J.B.K., 2015. *Uncaria tomentosa* increases growth and immune activity in *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus agalactiae*. *Fish Shellfish Immunol* 47, 630-638. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.09.051>

Zanatta, C.F., Cuevas, E., Bobbio, F.O., PeterWinterhalter, Adriana, Z., Mercadante, 2005. Determination of anthocyanins from Camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. *J. Agric. Food Chem* 53, 9531-9535. <https://doi.org/10.1021/jf051357v>

Zeng, K., Yang, N., Wang, D. et al. Resveratrol Prevents Retinal Dysfunction by Regulating Glutamate Transporters, Glutamine Synthetase Expression and Activity in Diabetic Retina. *Neurochem Res* 41, 1050–1064 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1793-9>

Zhang, J., Song, W., Sun, Y., Shan, A., 2017. Effects of phoxim-induced hepatotoxicity on SD rats and the protection of vitamin E. *Environ Sci Pollut Res Int* 24, 24916-24927. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0104-1>

Zhang, Q., Xiao, X., Zheng, J., Li, M., Yu, M., Ping, F., Wang, T., Wang, X., 2018. Compound Danshen Dripping Pill Inhibits Retina Cell Apoptosis in Diabetic Rats. *Frontiers in Physiology* 9, 1501. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01501>