

**MAURO MASSON LERCO**

## **Nefropatia Diabética Experimental**

Estudo de parâmetros clínicos, laboratoriais e análise ultra-estrutural e morfométrica da membrana basal e podócitos glomerulares de ratos diabéticos induzidos pela aloxana.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia – da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção do Título de Doutor.

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
2004

**MAURO MASSON LERCO**

## **Nefropatia Diabética Experimental**

Estudo de parâmetros clínicos, laboratoriais e análise ultra-estrutural e morfométrica da membrana basal e podócitos glomerulares de ratos diabéticos induzidos pela aloxana.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia – da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção do Título de Doutor.

*Orientador:* Prof. Dr. César Tadeu Spadella

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Lerco, Mauro Masson.

**Nefropatia Diabética Experimental.** Estudo de parâmetros clínicos, laboratoriais e análise ultra-estrutural e morfométrica da membrana basal e podócitos glomerulares de ratos diabéticos induzidos pela aloxana / Mauro Masson Lerco. – 2004.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2004.

Orientador: César Tadeu Spadella

Assunto CAPES: 40101002

1. Diabetes - Estudos experimentais

CDD 616.642

Palavras-chave: Membrana basal glomerular; Nefropatia Diabética; Ratos diabéticos aloxânicos; Slit diaphragm; Podócitos; Aloxana; Proteinúria

*Planeje o difícil enquanto ainda é fácil, faça o que é grande enquanto ainda é pequeno. Por isso, o sábio nunca faz o que é grande, e é por esse motivo que sempre alcança a grandeza.*

*Tao-Te-King*

À minha esposa *Ivânia* e aos meus filhos *Marcela* e *Mateus Eduardo*,  
cuja contribuição na forma de amor, foi essencial para que este trabalho  
fosse realizado.

Aos meus pais *Lila* e *Caetano*, que nortearam minha vida, me  
incentivaram e estiveram sempre do meu lado. Meu eterno  
agradecimento, admiração e amor.

## **Homenagem I**

Ao *Professor Dr. César Tadeu Spadella*, cuja orientação e profissionalismo me fizeram seguir em frente na realização deste trabalho.

## **Homenagem II**

À Professora Dra. *Maria Aparecida C. de Arruda Henry*, pela inestimável amizade, orientação e apoio.

## AGRADECIMENTOS

Minha profunda gratidão a *todos* que, direta ou indiretamente, ajudaram na elaboração deste trabalho. Em especial:

A *Professora Dra.Célia Sperandéo Macedo*, que me mostrou a perspectiva de estudar as lesões glomerulares, ajudando-me na redação do manuscrito, na leitura dos principais trabalhos, nas discussões sobre a nefropatia diabética e que gentilmente transmitiu o seu conhecimento com a maior clareza e sabedoria, dignos de admiração e respeito.

à *Prof. Dra. Elisa A. Gregório*, do Departamento de Microscopia eletrônica do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu – UNESP, pelo auxílio, compilação e interpretação dos resultados do estudo elétron-micrográfico do rim e aos demais funcionários *Nivalde Antonio Basso, Maria Helena Moreno, Maria Eleuda Lino Peres e Claudete dos Santos Tardivo*, que com muita paciência me ensinaram manusear o microscópio eletrônico e prepararam todo o material para realização das elétron-micrografia.

À pós-graduanda *Daniela de Oliveira Pinheiro* que permitiu e contribuiu para o estudo morfométrico das elétron-micrografias.

ao *Prof. Dr. Reinaldo José Silva*, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual de São Paulo, Campus de Botucatu, pela execução e orientação da análise estatística das elétrono-micrografias e confecções gráficas.

aos *colegas da Disciplina de Gastroenterologia Cirúrgica* do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, **pelo apoio recebido.**

aos *funcionários do Departamento de Cirurgia e Ortopedia* em especial ao *Sr. Henrique Pedroso de Camargo Moraes, Sra. Simone Barroso Corvino, Sra. Marinete Ribeiro Jorge e Sr. Carlos Eduardo Borgatto*, pelo auxílio nas atividades de apoio.

à *Profa. Dra. Lídia Raquel de Carvalho*, Departamento de Estatística do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu, professora e amiga, minha admiração pelo jeito sempre solidário e pela execução e orientação das análises estatísticas.

aos *funcionários do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia* da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, em particular à *Sra. Irene Spago, Sra. Maria Cecília Salgado Mercadante e Srta. Sônia Maria Capeletti* pelo relevante serviço no seguimento dos animais e procedimentos experimentais; e *Danilo Chaguri e Danilo César Borsatto* que prestaram seus serviços na manutenção e limpeza do laboratório.

aos *funcionários do Laboratório de Pesquisa Experimental do Departamento de Pediatria*, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em particular à *Sra. Neusa Maria Ferreira*, pela execução das dosagens bioquímicas, a qual foi assistida por *Paulo Sérgio Dionizio, Cristina Maria Fortes Rezende, Maria Regina Moretto de Oliveira e Alvina Franco Ramos*;

à *Sra. Enilze de Souza Nogueira Volpato* (Diretora da Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação), *Srta. Rosemary Cristina da Silva e Luciana Pizzani*, funcionárias da Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação do *Campus* de Botucatu – UNESP, pela grande ajuda na revisão das referências bibliográficas e na pesquisa de referências e a *Sra. Selma Maria de Jesus* na confecção da ficha catalográfica;

ao *Sr. Carlos Eduardo Borgatto*, pelo grande auxílio na digitalização das fotos, formatação da tese e da apresentação oral deste trabalho;

à *Srta. Regina Célia Spadim*, Chefe da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pela amizade, carinho e colaboração na realização desta tese;

# ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
1. Definição.....	02
2. Aspectos gerais.....	04
3. O estudo da nefropatia diabética experimental.....	08
<b>OBJETIVO</b> .....	12
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
1. Animais utilizados.....	15
2. Grupos Experimentais.....	15
2.1. Grupo Normal (G1).....	16
2.2. Grupo Diabético (G2).....	16
3. Parâmetros estudados.....	16
3.1. Clínicos.....	16
3.2. Laboratoriais.....	16
3.3. Ultra-estruturais.....	16
4. Momento do sacrifício dos animais.....	17
5. Técnicas utilizadas.....	17
5.1. Anestesia.....	17
5.2. Indução dos diabetes experimental.....	17
5.3. Momentos de Avaliação Clínica e Laboratorial.....	18
5.3.1. Metodologia Empregada na Coleta de Dados.....	19
5.4. Exames Laboratoriais.....	22
5.4.1. Dosagens de glicose plasmática e urinária.....	22
5.4.2. Pesquisa de glicosúria.....	22
5.4.3. Dosagens de proteína urinária.....	22
5.5. Sacrifício dos Animais.....	23
5.6. Exame Histológico ao microscópio eletrônico - preparo dos rins.....	23
5.7. Estudo morfométrico.....	25
5.7.1. Estudo ao microscópio eletrônico (ME).....	25
5.7.2. Estudo morfométrico - análise das imagens.....	25
5.7.3. Técnicas utilizadas para análise morfométrica.....	26
5.8. Métodos Estatísticos.....	29
5.8.1. Para estudo das variáveis clínicas e laboratoriais.....	29
5.8.2. Para análise dos resultados do estudo morfométrico.....	30
<b>RESULTADOS</b> .....	31
1. Quanto ao Método de Indução do Diabetes.....	32
2. Evolução Clínica.....	33
2.1. Grupo Normal (G1).....	33
2.2. Grupo Diabético (G2).....	33
3. Exames Laboratoriais.....	40
3.1. Grupo Normal (G1).....	40

3.2. Grupo Diabético (G2).....	40
4. Análise morfométrica.....	44
4.1. Espessura da Membrana Basal Glomerular (MBG) em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ).....	47
4.2. Número de podócitos por 2,5 $\mu\text{m}$ de MBG.....	48
4.3. Número de “slit diaphragm” por 2,5 $\mu\text{m}$ de MBG.....	49
4.4. Extensão dos “slit diaphragm” em $\mu\text{m}$ .....	50
<b>DISCUSSÃO</b> .....	51
1. Quanto aos Animais Utilizados.....	52
2. Quanto ao Tempo de Observação dos Animais.....	52
3. Quanto às Técnicas Utilizadas.....	53
3.1. Anestesia.....	53
3.2. Indução do Diabetes Experimental.....	53
4. Quanto à Evolução Clínica.....	59
5. Quanto aos Exames Laboratoriais.....	61
6. Quanto aos Parâmetros Histológicos - estudo morfométrico.....	62
6.1. Histopatologia Renal.....	62
<b>CONCLUSÕES</b> .....	74
<b>RESUMO</b> .....	76
<b>ABSTRACT</b> .....	79
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	82
<b>APÊNDICE</b> .....	98

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Modelo da barreira de filtração glomerular. As três camadas da barreira são: o revestimento fenestrado das células endoteliais, a membrana basal glomerular (MBG) e os processos podais com os “slit diaphragm” entrepostos. Adaptado de Tryggvason<sup>51</sup> **10**
- Figura 2.** Avaliação dos parâmetros clínicos e laboratoriais: A:- animal sob controle clínico em gaiola metabólica; B:- ratos em caixas aquecidas para vasodilatação da cauda e obtenção de sangue; C:- imobilização da cauda do animal; D:- secção da cauda e coleta de sangue. **21**
- Figura 3A.** MBG e podócitos no quadrante inferior direito, com imagens lineares. Aumento de 42.000 vezes. **28**
- Figura 3B.** MBG e podócitos no quadrante superior esquerdo e região central superior com imagens anguladas. Aumento de 42.000 vezes. **28**
- Figura 4.** Ratos com 12 meses de seguimento. Note a debilidade, caquexia e alteração da pelagem de um animal diabético (A), quando comparado à vitalidade de um animal normal de mesma idade (B). **35**
- Figura 5.** Ratos com 12 meses de seguimento. Detalhe do olho de um animal diabético com catarata (A) e de um animal normal, sem lesão (B). **35**
- Figura 6:** Média do peso (em gramas) em ratos normais (10 animais) e diabéticos (10 animais), no início do estudo e após 6 e 12 meses de seguimento. (\*) Estatística:  $p < 0,001$ . **36**
- Figura 7:** *Box plot* representando a dosagem da ingestão hídrica (ml/24 horas) em ratos normais (10 animais) e diabéticos (10 animais), no início do estudo e após 6 e 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística:  $p < 0,005$ . **37**
- Figura 8:** *Box plot* representando a dosagem da ingestão alimentar (g/12 horas) em ratos normais (10 animais) e diabéticos (10 animais), no início do estudo e após 6 e 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística:  $p = 0,003$ . **38**
- Figura 9:** *Box plot* representando a dosagem da diurese (ml/24 horas) em ratos normais (10 animais) e diabéticos (10 animais), no início do estudo e após 6 e 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior **39**

representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística:  $p < 0,001$ .

**Figura 10:** *Box plot* representando a dosagem da glicemia (ml/dl) em ratos normais (10 animais) e diabéticos (10 animais), no início do estudo e após 6 e 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística:  $p < 0,001$ . **41**

**Figura 11:** *Box plot* representando a dosagem de glicose urinária (ml/24 horas) em ratos normais (10 animais) e diabéticos (10 animais), no início do estudo e após 6 e 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística:  $p < 0,001$ . **42**

**Figura 12:** *Box plot* representando a dosagem de proteína urinária (mg/dl) em ratos Wistar normais (10 animais) e diabéticos (10 animais) após 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística:  $p < 0,001$ . **43**

**Figura 13.** Elétron-micrografia de glomérulo normal; notamos MBG não espessada e um número de podócitos e de “slit diaphragm” maior que o observado em ratos diabéticos (figura 14). Aumento de 42.000 vezes. **44**

**Figura 14.** Elétron-micrografia de glomérulo diabético; notamos espessamento da MBG e menor número de podócitos e de “slit diaphragm” por 2,5 $\mu$ m. Aumento de 42.000 vezes. **45**

**Figura 15.** *Box plot* representando a espessura média ( $\mu$ m) da membrana basal glomerular (MBG) em ratos normais (4 animais, 115 elétron-micrografias) e diabéticos (4 animais, 136 elétron-micrografias), com 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística:  $p < 0,001$ . **47**

**Figura 16.** *Box plot* representando o número de podócitos em 2,5  $\mu$ m de membrana basal glomerular (MBG) em ratos normais (4 animais, 115 elétron-micrografias) e diabéticos (4 animais, 136 elétron-micrografias), com 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) **48**

Estatística:  $p < 0,001$ .

**Figura 17.** *Box plot* representando o número de “slit diaphragm” em 2,5  $\mu\text{m}$  de membrana basal glomerular (MBG) em ratos normais (4 animais, 115 elétron-micrografias) e diabéticos (4 animais, 136 elétron-micrografias), com 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística:  $p < 0,001$ . **49**

**Figura 18.** *Box plot* representando a extensão dos “slit diaphragm” ( $\mu\text{m}$ ) da membrana basal glomerular (MBG) em ratos normais (4 animais, 115 elétron-micrografias) e diabéticos (4 animais, 136 elétron-micrografias), com 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística:  $p < 0,001$ . **50**

**Figura 19.** Após agressão, os podócitos podem sofrer apoptose ou desprendimento da MBG ou falta de proliferação. Esses eventos causam podocitopenia que contribui para a glomeruloesclerose progressiva. Adaptado de Mundel & Shankland<sup>48</sup>. **69**

**Figura 20.** Modelo molecular do “slit diaphragm”. As linhas verticais em azul representam os limites de dois processos podálicos adjacentes. A nefrina intracelular liga-se a podocina e a CD2 AP. A Neph 1 liga-se à podocina e ZO-1. A CD2AP liga-se à actina, alfa actina 4 e sinaptopodina. Essas interações proporcionam estabilidade ao “slit diaphragm” e talvez aos processos podálicos. Adaptado de Miner JH<sup>49</sup>. **71**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Médias e desvios-padrão do peso, em gramas, de animais dos grupos normal e diabético, nos momentos inicial (IN), 6º e 12º mês de seguimento, com a respectiva análise estatística.	<b>36</b>
<b>Tabela 2</b> - Medianas e amplitudes semi-interquartílicas da ingestão hídrica em ml/24horas dos animais dos grupos normal e diabético, no momento inicial (IN), 6º e 12º mês de seguimento, com a respectiva análise estatística.	<b>37</b>
<b>Tabela 3</b> - Medianas e amplitudes semi-interquartílicas da ingestão alimentar em g/12horas dos animais do grupo normal e diabético, nos momentos inicial (IN), 6º e 12º mês de seguimento, com a respectiva análise estatística.	<b>38</b>
<b>Tabela 4</b> - Medianas e amplitudes semi-interquartílicas da diurese em ml/24horas dos animais do grupo normal e diabético, nos momentos inicial (IN), 6º e 12º mês de seguimento, com a respectiva análise estatística.	<b>39</b>
<b>Tabela 5</b> - Medianas e amplitudes semi-interquartílicas da glicemia em mg/dl dos animais do grupo normal e diabético, nos momentos inicial (IN), 6º e 12º mês de seguimento, com a respectiva análise estatística.	<b>41</b>
<b>Tabela 6</b> - Medianas e amplitudes semi-interquartílicas da glicose urinária em mg/dl dos animais do grupo normal e diabético, nos momentos inicial (IN), 6º e 12º mês de seguimento, com a respectiva análise estatística.	<b>42</b>
<b>Tabela I</b> - Grupo Diabético - 12 MESES - Peso em gramas - Evolução no seguimento.	<b>99</b>
<b>Tabela II</b> - Grupo Normal - 12 MESES - Peso em gramas - Evolução no seguimento.	<b>99</b>
<b>Tabela III</b> - Grupo Diabético - 12 MESES- Ingestão hídrica em ml/24h - Evolução no seguimento.	<b>100</b>

<b>Tabela IV</b> - Grupo Normal - 12 MESES - Ingestão hídrica em ml/24h - Evolução no seguimento.	<b>100</b>
<b>Tabela V</b> - Grupo Diabético - 12 MESES-Ingestão alimentar em g/12h- Evolução no seguimento.	<b>101</b>
<b>Tabela VI</b> - Grupo Normal - 12 MESES- Ingestão alimentar em g/12h - Evolução no seguimento.	<b>101</b>
<b>Tabela VII</b> - Grupo Diabético - 12 MESES - Diurese em ml/24h - Evolução no seguimento.	<b>102</b>
<b>Tabela VIII</b> - Grupo Normal - 12 MESES - Diurese em ml/24h - Evolução no seguimento.	<b>102</b>
<b>Tabela IX</b> - Grupo Diabético - 12 MESES - Glicemia em mg/dl - Evolução no seguimento.	<b>103</b>
<b>Tabela X</b> - Grupo Normal - 12 MESES - Glicemia em mg/dl - Evolução no seguimento.	<b>103</b>
<b>Tabela XI</b> - Grupo Diabético - 12 MESES - Glicose urinária em mg/dl - Evolução no seguimento.	<b>104</b>
<b>Tabela XII</b> - Grupo Normal - 12 MESES - Glicose urinária em mg/dl - Evolução no seguimento.	<b>104</b>
<b>Tabela XIII</b> - Grupo Diabético - 12 MESES - proteinúria em mg/24horas - Evolução no seguimento.	<b>105</b>
<b>Tabela XIV</b> - Grupo Normal - 12 MESES - proteinúria em mg/24horas - Evolução no seguimento.	<b>105</b>
<b>Tabela XV.a. Rato diabético nº549.</b> Estudo morfométrico através da análise de détron-micrografias dos rins de ratos diabéticos, em sistema computadorizado para análise de imagens (Qwin Lite 2.5-Leica), avaliando os seguintes parâmetros: número de podócitos, número de “slit diafragm”, espessura da membrana basal glomerular (MBG) em $\mu\text{m}$ (micrômetro) e extensão do “slit diafragm” em $\mu\text{m}$ (micrômetro).	<b>106</b>
<b>Tabela XV.b. Rato diabético nº 597</b> Estudo morfométrico através da análise de détron-micrografias dos rins de ratos diabéticos, em sistema computadorizado para análise de imagens (Qwin Lite 2.5-Leica), avaliando os seguintes parâmetros: número de podócitos, número de “slit diafragm”, espessura da membrana basal glomerular (MBG) em $\mu\text{m}$ (micrômetro) e extensão do “slit diafragm” em $\mu\text{m}$ (micrômetro).	<b>107</b>

**Tabela XV.c. Rato diabético n° 631.** Estudo morfométrico através da análise de elétron-micrografias dos rins de ratos diabéticos, em sistema computadorizado para análise de imagens (Qwin Lite 2.5-Leica), avaliando os seguintes parâmetros: número de podócitos, número de “slit diafragm”, espessura da membrana basal glomerular (MBG) em  $\mu\text{m}$  (micrômetro) e extensão do “slit diafragm” em  $\mu\text{m}$  (micrômetro). 108

**Tabela XV.d. Rato diabético n° 647** Estudo morfométrico através da análise de elétron-micrografias dos rins de ratos diabéticos, em sistema computadorizado para análise de imagens (Qwin Lite 2.5-Leica), avaliando os seguintes parâmetros: número de podócitos, número de “slit diafragm”, espessura da membrana basal glomerular (MBG) em  $\mu\text{m}$  (micrômetro) e extensão do “slit diafragm” em  $\mu\text{m}$  (micrômetro). 109

**Tabela XVI.a. Rato normal n° 818.** Estudo morfométrico através da análise de elétron-micrografias dos rins de ratos normais, em sistema computadorizado para análise de imagens (Qwin Lite 2.5-Leica), avaliando os seguintes parâmetros: número de podócitos, número de “slit diafragm”, espessura da membrana basal glomerular (MBG) em  $\mu\text{m}$  (micrômetro) e extensão do “slit diafragm” em  $\mu\text{m}$  (micrômetro). 110

**Tabela XVI.b. Rato normal n° 819** Estudo morfométrico através da análise de elétron-micrografias dos rins de ratos normais, em sistema computadorizado para análise de imagens (Qwin Lite 2.5-Leica), avaliando os seguintes parâmetros: número de podócitos, número de “slit diafragm”, espessura da membrana basal glomerular (MBG) em  $\mu\text{m}$  (micrômetro) e extensão do “slit diafragm” em  $\mu\text{m}$  (micrômetro). 111

**Tabela XVI.c. Rato normal n°821.** Estudo morfométrico através da análise de elétron-micrografias dos rins de ratos normais, em sistema computadorizado para análise de imagens (Qwin Lite 2.5-Leica), avaliando os seguintes parâmetros: número de podócitos, número de “slit diafragm”, espessura da membrana basal glomerular (MBG) em  $\mu\text{m}$  (micrômetro) e extensão do “slit diafragm” em  $\mu\text{m}$  (micrômetro). 112

**Tabela XVI.d. Rato normal n° 823** Estudo morfométrico através da análise de elétron-micrografias dos rins de ratos normais, em sistema computadorizado para análise de imagens (Qwin Lite 2.5-Leica), avaliando os seguintes parâmetros: número de podócitos, número de “slit diafragm”, espessura da membrana basal glomerular (MBG) em  $\mu\text{m}$  (micrômetro) e extensão do “slit diafragm” em  $\mu\text{m}$  (micrômetro). 113

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

\* - asterisco

() - parêntese

/ - por ou para

= - igual

± - mais ou menos

< - menor

> - maior

x - por ou vezes

(+), (++) , (+++) - relativo à intensidade do achado, respectivamente leve, moderada, grave

(-) - relativo à ausência

°C - graus Celsius

% - porcentagem

pH - potencial hidrogeniônico (logaritmo decimal do inverso da atividade dos íons hidrogênio numa solução)

mg - miligrama

kg - quilograma

g - grama

µm - micrômetro

mm - milímetro

dl - decilitro

ml - mililitro

h - hora ACTH - hormônio adreno corticotrófico

DM - *Diabetes Mellitus*

DM 1 - *Diabetes Mellitus* tipo 1

DM 2 - *Diabetes Mellitus* tipo 2

MBG - Membrana Basal Glomerular

DCCT - Diabetes Complications and Control Trial

IPTR - International Pancreas Transplant Registry

G1 - grupo experimental normal

G2 - grupo experimental diabético

IN - momento inicial

M - molar

ME - microscópio eletrônico

p - (valor de p) - nível de significância estatística

m - mês

fig. - figura

---

# Introdução

## 1. Definição

O *Diabetes Mellitus* é uma doença caracterizada pela elevação da glicose no sangue. Pode ocorrer devido a defeitos na secreção ou na ação do hormônio insulina, que é produzido pelas células beta do pâncreas, nas ilhotas de Langerhans. A função principal da insulina é promover a entrada de glicose nas células do organismo, de forma a ser aproveitada para as diversas atividades celulares. A falta de insulina, ou um defeito na sua ação, resultam portanto, em acúmulo de glicose no sangue, o que chamamos de hiperglicemia.

Classicamente, o diabetes pode ser classificado, em dois grupos: *Diabetes Mellitus* tipo 1 (DM 1) e *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM 2). O DM 1 é uma forma de diabetes que resulta da destruição das células beta pancreáticas por um processo imunológico, ou seja, pela formação de anticorpos pelo organismo contra as próprias células beta, levando à deficiência primária de insulina. Estes anticorpos estão presentes em cerca de 85 a 90% dos casos de DM 1, no momento do diagnóstico. Em geral, este tipo de diabetes costuma acontecer em crianças e adultos jovens, mas pode acometer qualquer faixa etária.

O DM 2 é uma forma de diabetes que acomete cerca de 90% dos pacientes diabéticos. Nesses pacientes, a insulina é produzida pelas células beta pancreáticas, porém, sua ação está dificultada, caracterizando um quadro de resistência insulínica. Esta

alteração, por sua vez, leva a um aumento da produção de insulina pelo pâncreas para tentar manter a glicose em níveis normais. Todavia, quando este mecanismo compensatório não é mais possível, surge o diabetes.

Diferentemente do DM 1, a instalação do quadro clínico do DM 2 é mais lenta, sendo que os sintomas de sede, aumento da diurese e alterações visuais podem demorar vários anos para se manifestar. O DM 1 também está associado com o aumento de peso corporal e obesidade, acometendo principalmente adultos a partir dos 50 anos. Contudo, observa-se, cada vez mais, o desenvolvimento do quadro em adultos jovens e até em crianças. Isso se deve, principalmente, ao aumento do consumo de gorduras e carboidratos, aliados à falta de atividade física.

Outros tipos de diabetes são bem mais raros e incluem defeitos, tanto genéticos da função da célula beta, como da ação da insulina. O diabetes também pode surgir no curso das doenças do pâncreas (pancreatite, tumores pancreáticos, hemocromatose); das doenças endócrinas (síndrome de Cushing, hipertireoidismo e acromegalia) e após o uso de certos medicamentos. Há ainda um tipo de diabetes que ocorre na gestação (diabetes gestacional), que pode ser transitório e que, ao término da gravidez, deve ser investigado e acompanhado. Na maioria das vezes ele é detectado no 3º trimestre da gravidez, através de um teste de sobrecarga de glicose<sup>1</sup>.

## 2. Aspectos gerais

O *Diabetes Mellitus*, tradicionalmente, sempre foi ligado a países ricos, mas está se tornando cada vez mais comum nos países em desenvolvimento, em razão do aumento da expectativa de vida e da adoção de hábitos pouco saudáveis, como a má alimentação e o sedentarismo.

O *Diabetes Mellitus* é considerado, hoje, um problema de saúde pública mundial, tanto em termos de número de pessoas afetadas e mortalidade prematura, como também, em relação aos custos envolvidos no seu controle e no tratamento de suas complicações. O agravante dessa situação é que existe, ainda, uma tendência para o aumento da prevalência da doença em todo o mundo. Projeções para este século indicam que no ano 2010 deverão existir 239 milhões de diabéticos no mundo<sup>2</sup>. No Brasil estima-se, atualmente, uma prevalência de 7,6% de pacientes diabéticos, que correspondem a cerca de 12 milhões de pessoas, das quais 10% são diabéticas do tipo 1, e 50% desconhecem a sua condição de doente, sendo provavelmente identificadas, no futuro, através de uma complicação da doença<sup>3</sup>. Além do número crescente de casos, observa-se uma elevação da morbidade e mortalidade relacionada à doença<sup>4</sup>.

Em que pese os avanços conseguidos, o diabetes ainda é uma das principais causas de incapacitação física para o trabalho, tornando o seu portador 25 vezes mais propenso à cegueira, 17

vezes mais susceptível à nefropatia, com chances cinco vezes maiores de amputação de membros e risco duas vezes maior de doença cardiovascular<sup>5,6</sup>.

O diabetes está associado com o aumento da aterosclerose, observada em autópsias de pacientes com infarto agudo do miocárdio, tendo uma incidência duas vezes maior desta complicação, quando comparada com os indivíduos não-diabéticos. A doença também aumenta o risco para o desenvolvimento de trombose e infarto cerebral, bem como a frequência de gangrena de membros inferiores<sup>7</sup>.

A nefropatia diabética se desenvolve em 25 a 35% dos pacientes com diabetes tipo 1, e em 8 a 10% dos pacientes com DM 2, sendo que, pelo menos 80% dos pacientes diabéticos com insuficiência renal terminal têm DM 2<sup>8</sup>.

O diabetes é a principal causa de insuficiência renal crônica nos Estados Unidos, constituindo uma das mais graves complicações no paciente diabético, em longo prazo. Cerca de um terço ou mais dos pacientes com essa complicação têm, *Diabetes Mellitus*<sup>9</sup>. Relato do "US Renal Data System" de 2000<sup>10</sup> cita que mais de 44% dos pacientes que iniciam o tratamento da insuficiência renal são diabéticos<sup>10</sup>.

A nefropatia diabética é uma das doenças de caráter sistêmico mais freqüente em nosso meio, sendo causa de insuficiência renal crônica em 10 a 15% dos pacientes que iniciam o tratamento dialítico nas áreas metropolitanas brasileiras<sup>11</sup>.

Evidências indicam que a nefropatia diabética é o resultado das alterações metabólicas que ocorrem nos glomérulos renais, após longo tempo de exposição a níveis glicêmicos elevados. As principais lesões glomerulares são: expansão mesangial e aumento do espessamento da membrana basal glomerular (MBG), presentes, em média, após um período de 10 anos de diabetes.

A reprodução das alterações provocadas pelo diabetes no ser humano, em animais de experimentação, tem sido o caminho acessível para o estudo e melhor compreensão da maioria das lesões crônicas do diabetes, em particular das alterações renais<sup>12,13,14</sup>.

Dessa forma, são confirmados em modelos animais o papel das alterações metabólicas do diabetes sobre o desenvolvimento das lesões renais, através de estudos de prevenção e/ou reversão destas lesões crônicas, após a normalização do metabolismo glicídico, com o emprego do transplante pancreático ou do tratamento com insulina<sup>15,16,17,18,19</sup>.

O papel da glicemia como fator de risco para as lesões renais e oculares causadas pelo diabetes foi provado em estudo multicêntrico realizado pelo grupo de pesquisa americano DCCT<sup>20</sup> que estudou, durante 8 anos, pacientes com controles rigorosos da glicemia, obtendo-se menor progressão da retinopatia e menor incidência de microalbuminúria e proteinúria, quando comparado com pacientes com controle não rigoroso da glicemia<sup>20</sup>.

Tanto o estudo multicêntrico realizado pelo DCCT<sup>20</sup>, como o estudo prospectivo do diabetes do Reino Unido<sup>21</sup>,

mostraram que a terapêutica intensiva pode reduzir significativamente o risco de desenvolvimento de microalbuminúria e nefropatia no diabetes.

Entretanto, quando as alterações metabólicas já resultaram em uma nefropatia diabética definida, as modalidades terapêuticas são claramente insuficientes, e o rim terminal pode ser retardado mas não evitado<sup>9,22</sup>.

Em pacientes transplantados renais, cujo controle glicêmico não foi rigoroso nos primeiros 5 anos, foram encontradas lesões renais, em contraposição aos que realizaram controle rigoroso da glicemia<sup>23</sup>.

Atualmente, o transplante pancreático isolado ou combinado com o rim é a melhor opção terapêutica para suprir a falência endócrina do pâncreas em pacientes com DM 1, com ou sem insuficiência renal terminal. Este método, não só é capaz de controlar as alterações clínicas e metabólicas determinadas pela doença, como tem mostrado potencial para prevenir, estabilizar ou mesmo reverter as lesões crônicas do diabetes<sup>24,25,26</sup>.

Estudo a longo prazo de seguimento de pacientes diabéticos tipo 1, durante dez anos após realização do transplante pancreático, com normoglicemia, tem mostrado a reversão de lesões renais estabelecidas em rins nativos previamente acometidos pela nefropatia diabética<sup>24</sup>.

Esses resultados vêm salientar o papel do controle eficaz da glicemia na gênese e progressão das lesões renais determinadas

pelo diabetes, tendo incentivado pesquisadores em todo o mundo, tanto ao nível nacional<sup>27,28</sup> como internacional<sup>26,29,30</sup>, a utilizar o transplante pancreático como uma forma diferenciada de tratamento do diabetes.

Até junho de 2003 haviam sido notificados ao International Pancreas Transplant Registry (IPTR), mais de 19600 transplantes de pâncreas<sup>25</sup>, dos quais cerca de 300 casos brasileiros<sup>27,28</sup>. Apesar dessas perspectivas promissoras, muitos aspectos relativos ao tratamento do *Diabetes Mellitus*, e ao próprio conhecimento da doença, ainda são pouco esclarecidos, exigindo novas investigações.

### **3. O estudo da nefropatia diabética experimental**

Para o estudo da nefropatia diabética experimental, e de outras lesões diabéticas, o rato com diabetes induzido pela aloxana tem sido amplamente utilizado em muitos centros, e em nosso serviço<sup>31,32,33,34,35,36,37,38,39,40</sup>.

Esse animal apresenta lesões semelhantes às observadas na nefropatia diabética humana, tanto em estudos à microscopia óptica, como à microscopia eletrônica<sup>41,42,43,44</sup>. Os ratos diabéticos desenvolvem proteinúria crescente, a partir da 4ª semana de indução do diabetes, e a partir dos 6 meses de doença, apresentam lesões renais evidentes, em relação aos animais controle não

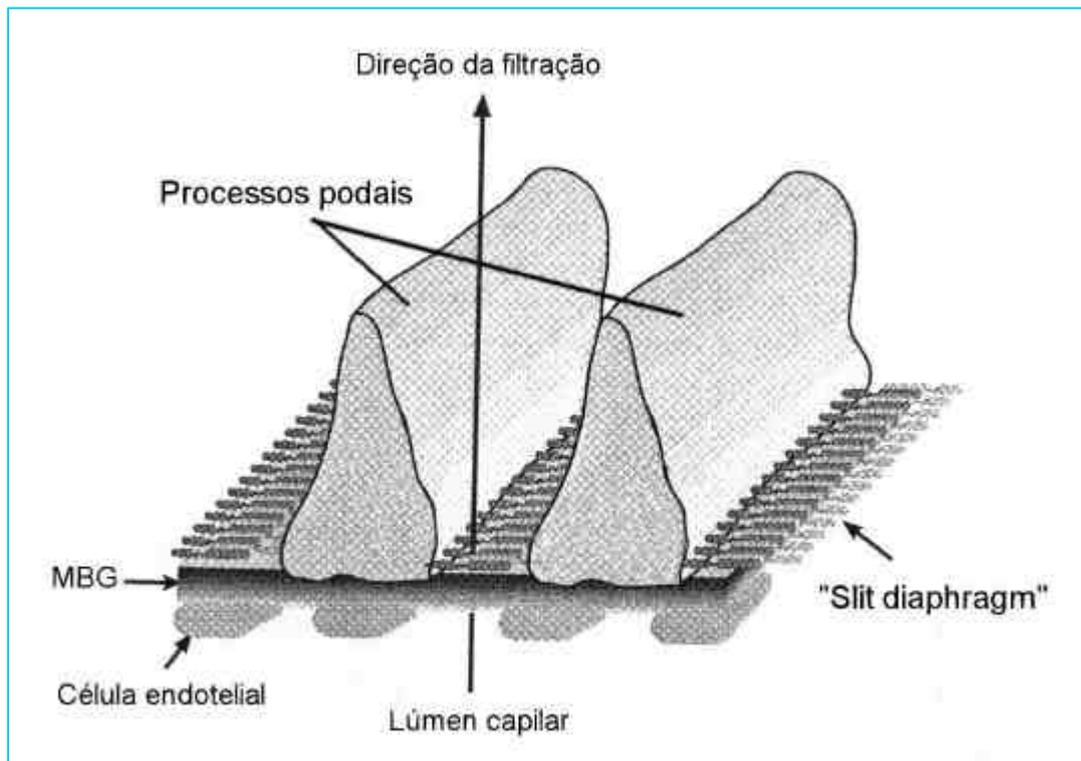
diabéticos, caracterizadas por espessamento da MBG, expansão mesangial e da cápsula de Bowmann e lesões tubulares<sup>15,45</sup>.

Em alguns estudos tem sido avaliada a contribuição da célula epitelial visceral glomerular, ou podócito, na progressão da doença renal diabética e não diabética<sup>46,47</sup>. Os podócitos apresentam uma estrutura especializada que se constitui em uma barreira à saída de proteínas através da urina. Admite-se, atualmente, que o espaço entre os podócitos, também denominado de fenda diafragmática ou “slit diaphragm”, termo consagrado e arraigado entre os nefrologistas, seja uma estrutura diferenciada e complexa, onde a presença de várias moléculas exercem o papel de um filtro, o qual previne a saída de proteínas na urina<sup>48,49</sup>.

A elevação progressiva da excreção de proteína pela urina, que caracteriza a nefropatia diabética, aponta para um papel do podócito na sua patogênese. Índios Pima, com nefropatia clínica, têm menos podócitos por glomérulos do que aqueles que não têm nefropatia. Uma vez que os podócitos não apresentam capacidade de regeneração, esta observação sugere que a sua perda ou o menor número, contribua para o desenvolvimento ou a progressão da glomérulo-esclerose diabética<sup>46</sup>.

Vestra et al<sup>50</sup> relataram alterações na estrutura e densidade dos podócitos, desde os estágios iniciais da nefropatia diabética, e a piora dessas lesões com o aumento da excreção de albumina urinária em pacientes com DM 2.

Na figura 1 apresentamos o modelo da barreira de filtração glomerular, a qual tem sido considerada um dos elementos mais diretamente envolvidos na gênese da proteinúria observada no curso da nefropatia diabética.



**Figura 1.** Modelo da barreira de filtração glomerular. As três camadas da barreira são: o revestimento fenestrado das células endoteliais, a membrana basal glomerular (MBG) e os processos podais com os "slit diaphragm" entrepostos. Adaptado de Tryggvason<sup>51</sup>.

Outros estudos também demonstram que as alterações estruturais dos podócitos ocorrem nos estágios iniciais da nefropatia diabética e são relacionados com o nível de excreção urinária de albumina. Os podócitos são parte integrante da barreira de filtração e as alterações de sua estrutura têm sido observadas em grande

número de doenças glomerulares, incluindo a nefropatia diabética<sup>46,52</sup>.

Em estudo anterior, realizado no nosso laboratório (Lerco<sup>40</sup>), demonstrou-se, pela microscopia óptica, a presença de lesões glomerulares típicas da nefropatia diabética em ratos diabéticos aloxânicos, estudados precocemente e tardiamente após indução do diabetes<sup>33,34,35,36,37,38,39,40</sup>.

Todavia, diante da importância do estudo da nefropatia diabética e das estruturas glomerulares implicadas na sua gênese, desenvolvemos esta pesquisa visando aprofundar os nossos conhecimentos acerca da ultra-estrutura desses glomérulos, com ênfase ao estudo dos podócitos glomerulares, ao nosso ver, um dos elementos de contribuição mais recente para o entendimento da fisiopatologia do diabetes, e para o melhor tratamento e prevenção da nefropatia diabética.



**Objetivo**

O objetivo deste trabalho foi estudar em ratos diabéticos aloxânicos proteinúricos, com 12 meses de seguimento, a espessura da membrana basal glomerular, as alterações do número de podócitos e de “slit diaphragm”, bem como a extensão dos “slit diaphragm” dos podócitos glomerulares, por microscopia eletrônica e morfometria.

---

## **Material e Métodos**

## 1. Animais utilizados

Foram utilizados, no presente trabalho, 60 ratos alogênicos (*Rattus wistar*) de ambos os sexos, adultos, sadios ao exame clínico, pesando entre 200 e 300 g, com aproximadamente três meses de idade, fornecidos pelo Biotério Central do *Campus* de Botucatu – UNESP. Após um período de adaptação de sete dias, dez animais foram sorteados para compor o **Grupo Normal (G1)**. Os 50 animais restantes foram submetidos à injeção endovenosa de aloxana (5,6 Dioxiuracil monohidrato)<sup>1</sup> diluída em solução aquosa a 2%, na dose única de 42 mg/kg de peso corporal. Desses, 20 animais desenvolveram diabetes experimental grave tendo sido alocados no **Grupo Diabético (G2)**. Os demais foram desprezados por não terem ficado diabéticos, por apresentarem valores glicêmicos intermediários ou morrido após terem sido inoculados. Dos animais diabéticos graves do G2, caracterizados em seguimento de 12 meses, 50% morreram, tendo-se concluído o estudo com dez animais diabéticos.

## 2. Grupos Experimentais

Como descrito, os animais estudados na presente investigação foram oriundos de dois grupos experimentais:

---

<sup>1</sup> Alloxan-Sigma Chemical Co. – St. Louis – USA

### **2.1. Grupo Normal (G1)**

Constituído de dez ratos saudáveis, não diabéticos.

### **2.2. Grupo Diabético (G2)**

Constituído de 20 ratos diabéticos graves, sem qualquer tipo de tratamento para o diabetes, dos quais, dez chegaram vivos aos 12 meses de seguimento, tendo sido sacrificados para o estudo.

## **3. Parâmetros Estudados**

Foram estudados nos dois grupos de animais os seguintes parâmetros:

### **3.1. Clínicos:**

Evolução clínica: aspecto geral dos animais, aferição do peso corporal, ingestão hídrica e diurese de 24 horas e ingestão alimentar de 12 horas.

### **3.2. Laboratoriais:**

Exames bioquímicos: glicemia de jejum, glicose urinária e proteinúria de 24 horas;

### **3.3. Ultra-estruturais:**

Morfometria de estruturas glomerulares: Medidas de espessura da membrana basal glomerular (MBG), determinação do número de podócitos, número de fendas “slit diaphragm” por extensão de MBG e extensão das fendas “slit diaphragm”.

#### 4. Momento do sacrifício dos animais

Depois de 12 meses de seguimento os animais de ambos os grupos experimentais foram sacrificados, sob anestesia, sendo retirado o rim direito para as análises histopatológicas, e a urina e o sangue para os exames bioquímicos.

#### 5. Técnicas Utilizadas

##### 5.1. Anestesia

O sacrifício dos animais foi realizado sob anestesia com pentobarbital sódico<sup>2</sup> na dosagem de 30 mg/kg de peso corporal, por via intraperitoneal, injetado no quadrante inferior esquerdo do abdome.

##### 5.2. Indução do Diabetes Experimental

O diabetes experimental foi induzido pela administração de uma solução aquosa de aloxana a 2%, injetada por via endovenosa, na dose única de 42 mg/kg de peso corporal, utilizando uma das veias da cauda do animal.

Após jejum alimentar de 12 horas, com fornecimento de água "*ad libitum*", cada rato foi colocado em uma caixa aquecida com lâmpada elétrica, durante um período de aproximadamente

---

<sup>2</sup> Cristália Produtos Químicos Farm. Ltda. – Itapira - SP

dez minutos; tempo necessário para uma boa visualização das veias da cauda. Após esse procedimento, o animal foi contido em uma pequena caixa individual, tendo sua cauda exposta, após o que se procedeu à inoculação da droga, utilizando-se agulhas de calibre 13 x 4,5 mm. Decorridos 30 minutos, os animais foram realimentados.

No presente estudo, foram utilizados, apenas, os animais que apresentaram perda de peso, elevação significativa da ingestão hídrica e do débito urinário, acompanhados de alterações laboratoriais, compatíveis com diabetes grave, em duas determinações sucessivas (7 e 14 dias após a indução), representadas por glicemia de jejum acima de 200 mg/dl, glicose urinária maior ou igual a 3000 mg/dl e glicosúria positiva (+++) no teste de fitas reagentes (Uriscan Gluketo)<sup>3</sup>.

Os animais cujos valores glicêmicos foram menores que 120 mg/dl, ou que apresentaram glicemias intermediárias entre 120 e 200 mg/dl, foram desprezados.

### **5.3. Momentos de Avaliação Clínica e Laboratorial**

Os dados clínicos de ambos os grupos experimentais, incluindo peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, bem como os dados laboratoriais referentes às dosagens de glicose plasmática e glicose urinária de todos os animais foram realizados, inicialmente (IN), com 14 dias de seguimento no Grupo Normal (G1) e no 14<sup>o</sup> dia após a indução do diabetes no Grupo Diabético

---

<sup>3</sup> Pharmaceutical Corp. YEONGDONG – Seoul Korëa

(G2). Posteriormente, as avaliações foram feitas após o 6<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> mês de diabetes ou seguimento experimental.

No dia anterior ao sacrifício foi coletado urina de 24 horas para dosagem de proteína urinária. Este parâmetro somente foi avaliado no 12<sup>o</sup> mês de seguimento experimental.

### 5.3.1. Metodologia Empregada na Coleta de Dados

Para a coleta dos dados clínicos e laboratoriais, cada animal foi submetido a um esquema padronizado de avaliação. A metodologia foi a seguinte:

- a) colocação dos animais em gaiolas metabólicas individuais durante 24 horas;
- b) fornecimento de volume conhecido de água durante todo o período de 24 horas (Figura 2-A);
- c) fornecimento de quantidades conhecidas de ração Nuvilab-CR1<sup>4</sup> durante o período noturno de 12 horas, após o que, se retirou toda a alimentação, por um período diurno de no mínimo oito horas (jejum de oito horas);
- d) determinação, no final do procedimento, do peso do animal em gramas, do volume de água ingerido em 24 horas (ingestão hídrica de 24 horas em mililitros), da quantidade de alimento consumido em 12 horas (ingestão alimentar de 12 horas em gramas) e do volume de diurese de 24 horas (diurese de 24 horas em mililitros);
- e) coleta de amostra de 10ml de urina coletada em 24 horas, para a dosagem de glicose urinária em miligramas por decilitro e cetonúria após jejum de oito horas, seguida da realização de glicosúria através de fitas reagentes;

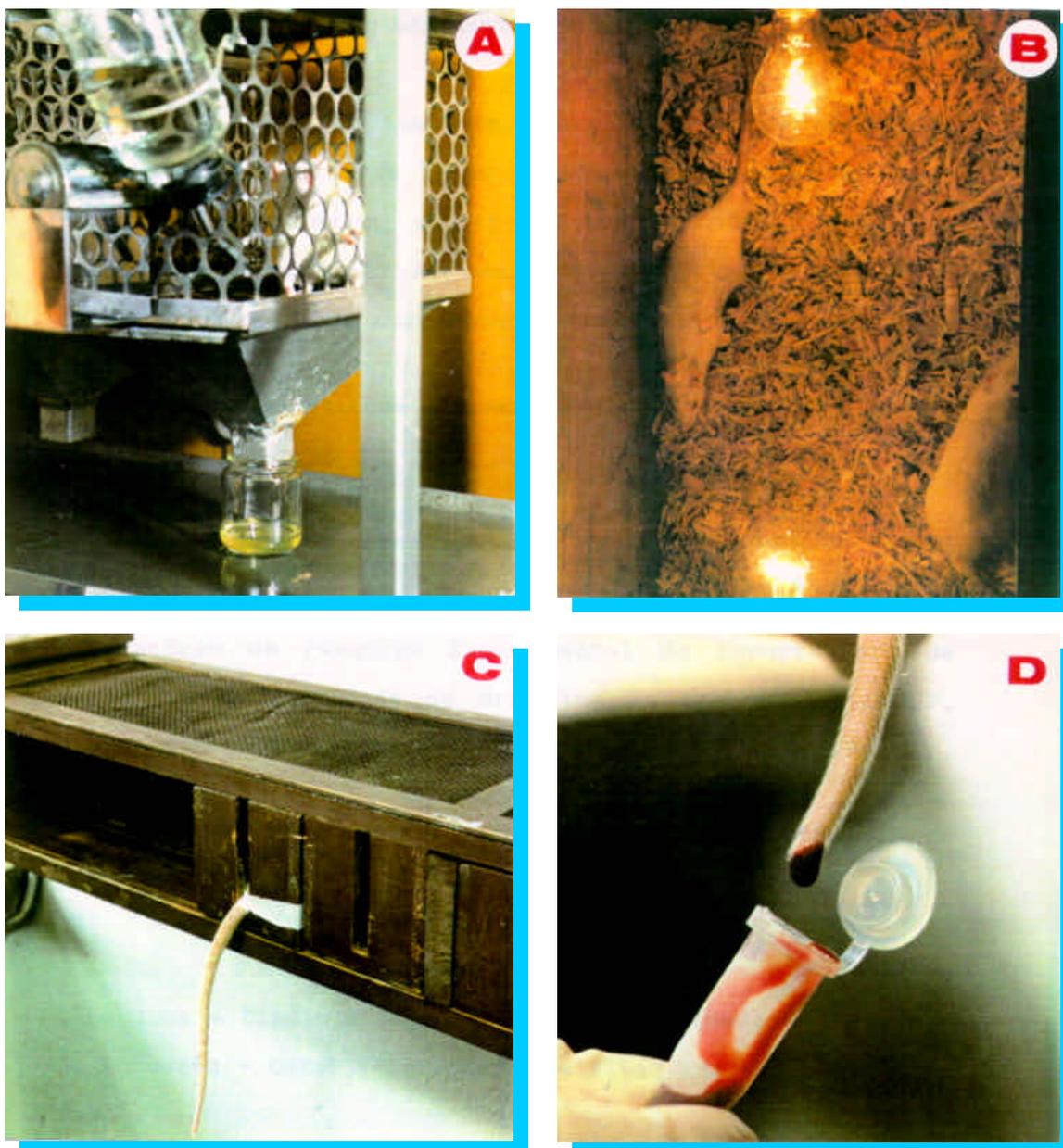
---

<sup>4</sup> NUVITAL Nutrientes Produtos Veterinários Ltda. – Curitiba - PR

- f) coleta de urina de 24 horas, no dia anterior ao sacrifício, para dosagem da proteína urinária em miligramas por 24 horas.
- g) coleta de uma amostra de 1,5ml de sangue para a dosagem da glicose plasmática, em miligramas por decilitro, após jejum de no mínimo oito horas.

Para a realização deste item, os animais foram colocados em caixa aquecida com lâmpadas incandescentes, à temperatura de 39-45°C, por um período de 10 minutos. A seguir, foram sangrados, sob anestesia, por secção da cauda, com retirada do volume de sangue necessário para os exames bioquímicos. Posterior a esse procedimento, a cauda seccionada foi amarrada, com finalidade hemostática, com fio de algodão 2-0 (Figura 2-B,C,D). Os animais foram, então, acomodados em caixas individuais, recebendo água e ração “*ad libitum*”.

No momento do sacrifício (12<sup>o</sup> mês), o sangue foi coletado por punção cardíaca a céu aberto.



**Figura 2.** Avaliação dos parâmetros clínicos e laboratoriais: A:- animal sob controle clínico em gaiola metabólica; B:- ratos em caixas aquecidas para vasodilatação da cauda e obtenção de sangue; C:- imobilização da cauda do animal; D:- secção da cauda e coleta de sangue.

## **5.4. Exames Laboratoriais**

### **5.4.1. Dosagens de glicose plasmática e urinária**

Foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Experimental do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, empregando-se o método por dosagem enzimática (Glicose -E )<sup>5</sup>.

### **5.4.2. Pesquisa de glicosúria**

Foi realizada no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, empregando-se fitas reagentes (Uriscan Gluketo)<sup>6</sup>.

### **5.4.3. Dosagens de proteína urinária**

Foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Experimental do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, através da acidificação da urina e análise da sua densidade óptica por espectrofotometria.

---

<sup>5</sup> CELM Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos – Barueri - SP

<sup>6</sup> Bayer Corporation, Diagnostics Division – Tarrytown – NY - USA

## 5.5. Sacrifício dos Animais

Os animais foram sacrificados, após anestesia e abertura do tórax, por meio de hemorragia aguda, conseqüente à punção cardíaca para a coleta do sangue destinado à realização de exames laboratoriais, seguida da secção da veia cava após a desembocadura das veias hepáticas.

## 5.6. Exame histológico ao microscópio eletrônico - preparo dos rins

Após a retirada do rim direito, foram imediatamente seccionados fragmentos representativos da região cortical renal de quatro ratos de cada grupo experimental, escolhidos ao acaso. Os mesmos foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,3 e a seguir submetidos aos seguintes procedimentos:

- Lavagem em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 (três vezes por cinco minutos cada uma.),
- Pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por duas horas,
- Lavagem em água destilada três vezes por cinco minutos cada uma,
- Incubação em acetato de uracila 0,5% em solução aquosa por duas horas,
- Desidratação em seqüência crescente de solução de acetona, a 50% duas vezes de dez minutos, 70% duas

vezes de dez minutos, 90% duas vezes de 15 minutos e 100% três vezes de 15 minutos.

- Embebição em mistura de 1:1 em resina (Araldite grade 502) e acetona 100% por 12 horas,
- Embebição em resina pura durante uma hora em estufa à 37°C,
- Inclusão em resina pura e polimerização por 72 horas em estufa à 60°C .

Foram feitos cinco a seis blocos contendo tecido renal. Os blocos foram preparados por trimagem manual, sendo obtidos cortes de 0,5µm corados com mistura de azul de toluidina a 1% e bórax a 1% . Estes cortes foram examinados ao microscópio de luz para pesquisa da presença de glomérulos. Constatando-se os glomérulos, oito para cada animal, os blocos foram selecionados para estudo de cortes ultrafinos; estes foram contrastados com solução saturada de acetato de uranila em álcool 50% e, posteriormente, em citrato de chumbo, durante 20 minutos.

Os cortes ultrafinos preparados foram examinados ao microscópio eletrônico de Transmissão “CM-100 Philips export B.V.”, sendo utilizados filmes 35mm “Eastman 5302” (Kodak<sup>R</sup>), para documentação elétron-micrográfica. Toda documentação elétron-micrográfica foi feita com aumento de 42.000 vezes.

## 5.7. Estudo morfométrico

### 5.7.1. Estudo ao microscópio eletrônico (ME)

Para o estudo ao ME foram estabelecidos dois critérios:

1) Foram fotografados no mínimo 100 “slit diaphragm” por animal;

2) As elétron-micrografias foram obtidas, sempre que possível, em áreas glomerulares onde a estrutura da MBG e a dos podócitos apresentassem, na sua maior extensão, uma imagem linear sem angulações. Foram examinados oito glomérulos de cada animal, em cada grupo experimental. Em cada glomérulo foram estudados: espessura da MBG, número de podócitos, número de “slit diaphragm” e extensão dos “slit diaphragm”.

Considerando-se os dois critérios descritos foram obtidas 115 elétron-micrografias do grupo normal e 138 do grupo diabético; após obtenção das elétron-micrografias procedeu-se a cópia digital pelo “scanner” e posterior estudo morfométrico computadorizado.

### 5.7.2. Estudo morfométrico - análise das imagens

O estudo morfométrico do tecido renal foi realizado sem o conhecimento prévio do grupo ao qual o animal pertencia. Foi utilizado o sistema computadorizado para análise de imagens “Qwin Lite 2,5-LEICA”; segundo o qual, as imagens copiadas pelo

“scanner” das elétron-micrografias eram projetadas em tela de computador, sendo escolhidas pelo observador as áreas a serem medidas, e/ou contadas.

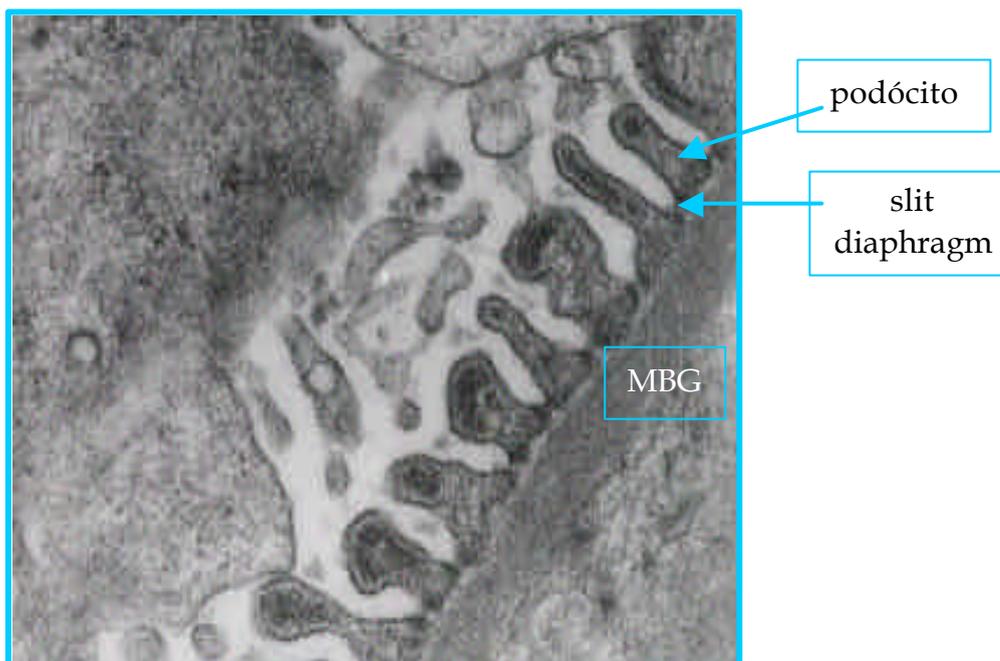
### 5.7.3. Técnicas utilizadas para análise morfométrica

- A. Para a realização das medidas da espessura da MBG, tomou-se como referência a região central de cada podócito, que ao exame se mostrasse com as estruturas lineares. Foram realizadas tantas medidas por elétron-micrografias, quantas áreas centrais de podócitos, com estruturas lineares, observadas. Estas medidas foram expressas em valores mínimos, médios e máximos.
- B. Para a determinação do número de podócitos, foram computadas as estruturas dos podócitos que apresentavam nitidez e que estavam localizadas nas regiões centrais da elétron-micrografia, onde a MBG era retilínea, sendo desprezadas as estruturas localizadas em áreas com angulações. O número de podócitos foi expresso por 2,5 $\mu$ m de extensão de MBG.
- C. O número de “slit diaphragm” de cada elétron-micrografia foi igualmente obtido por 2,5 $\mu$ m de

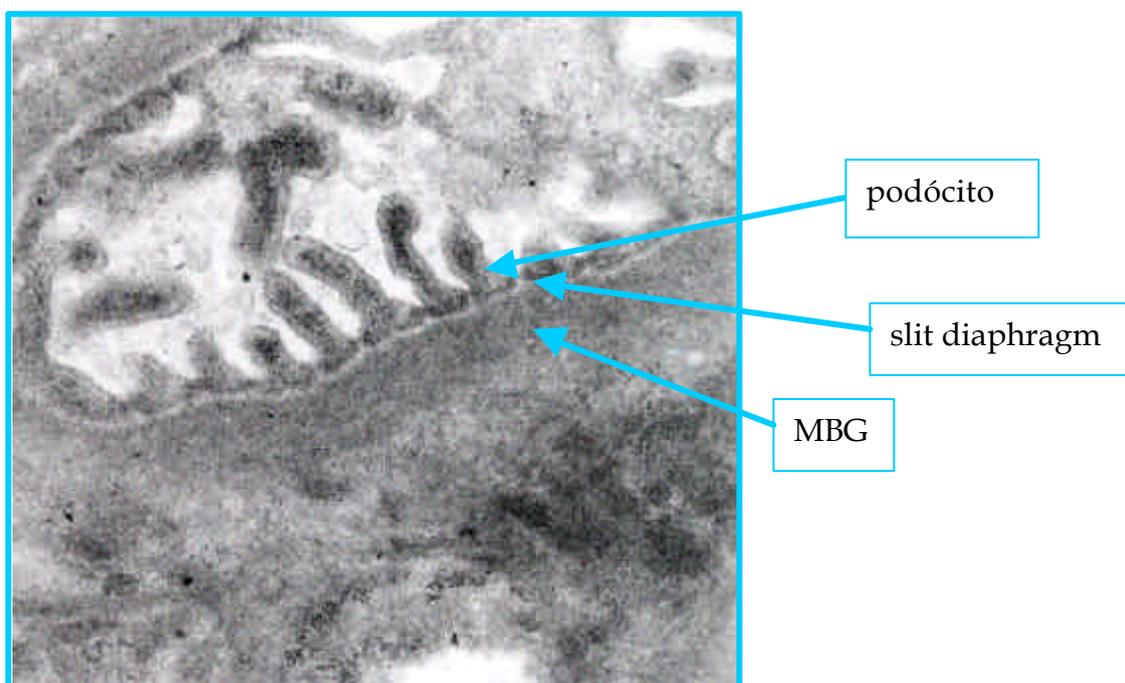
extensão de MBG de cada elétron-micrografia e em apenas estruturas lineares.

D. A extensão dos “slit diaphragm” foi obtida em  $2,5\mu\text{m}$  de extensão de MBG, entre dois podócitos lineares. Os dados foram expressos em valores mínimos, médios e máximos.

Nas figuras: 3A e 3B estão representadas elétron-micrografias de tecido renal, cujos cortes resultaram em estruturas da MBG, podócitos e “slit diaphragm” com imagens lineares (3A) e com imagens prejudicadas pela angulação (3B).



**Figura 3A.** MBG e podócitos no quadrante inferior direito, com imagens lineares. Aumento de 42.000 vezes.



**Figura 3B.** MBG e podócitos no quadrante superior esquerdo e região central superior com imagens anguladas. Aumento de 42.000 vezes.

## 5.8. Métodos Estatísticos

### 5.8.1. Para estudo das variáveis clínicas e laboratoriais

O estudo das variáveis clínicas (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese) e laboratoriais (glicemia, glicose urinária e proteinúria), nos grupos controle e diabético, foi realizado pela análise de variância de perfil (dois grupos em três momentos), complementado com o teste de comparações múltiplas de Tukey<sup>53,54</sup> e análise não paramétrica “Mann-Whitney”<sup>54</sup> e “Kruskal-Wallis”<sup>54</sup> para as variáveis que tiveram resultados com uma distribuição heterogênea.

A indicação das significâncias entre as médias ou medianas foi realizada através de letras minúsculas para comparação de grupos fixado o momento e letras maiúsculas para comparação dos momentos dentro do grupo. A interpretação das letras deve ser feita da seguinte maneira:

1. duas médias ou medianas seguidas de uma mesma letra minúscula não diferem quanto à resposta dos grupos num determinado momento;
2. duas médias ou medianas seguidas de letras minúsculas não iguais diferem significativamente quanto à resposta dos grupos num determinado momento;
3. duas médias ou medianas seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula não diferem quanto às respostas

dos momentos dentro do grupo especificado. Todavia, em médias seguidas de letras maiúsculas não iguais houve diferenças estatisticamente significativas entre os momentos.

O nível de significância adotado foi de 5%.

### **5.8.2. Para análise dos resultados do estudo morfométrico**

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise não-paramétrica pelo teste “Mann-Whitney”<sup>54</sup> usando o software Sigma-Stat 2.0. para comparação dos valores dos diferentes animais (diabéticos e não diabéticos). O nível de significância adotado foi de 5%.



## Resultados

## 1. Quanto ao Método de Indução do Diabetes

A injeção endovenosa de aloxana numa das veias da cauda do rato foi realizada com bastante facilidade, uma vez que, antes da injeção, o animal foi colocado durante dez minutos no interior de uma caixa aquecida com lâmpadas elétricas, o que proporcionou um grau de vasodilatação evidente.

Foram considerados diabéticos graves os animais que apresentaram, no período pós-indução, perda progressiva de peso, aumento significativo da ingestão hídrica, da ingestão alimentar e da diurese; valores de glicemia acima de 200 mg/dl, da glicose urinária superior ou igual a 3.000 mg/dl e glicosúria (+++), presentes em duas determinações sucessivas (7 e 14 dias após a indução).

Dos 50 animais submetidos à injeção endovenosa de aloxana, diluída em solução aquosa a 2%, na dose de 42 mg/kg de peso corporal, dez ratos (20%) não ficaram diabéticos ou desenvolveram a doença numa gravidade leve ou moderada, sendo desprezados. Dos 40 animais restantes que desenvolveram diabetes grave, 20 ratos morreram durante as primeiras duas semanas após a indução, sendo que dos 20 animais diabéticos graves colocados em seguimento, dez (50%) morreram no seguimento tardio em decorrência de distúrbios metabólicos, infecção pulmonar e/ou caquexia. Não houve óbito no grupo normal.

## **2. Evolução Clínica**

### **2.1. Grupo Normal (G1)**

Os dez animais desse grupo evoluíram sem quaisquer alterações clínicas durante todo experimento, sendo sacrificados com 12 meses de seguimento, em bom estado geral (Figuras 4B e 5B). Os parâmetros clínicos representados pela evolução do peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese mantiveram-se dentro dos níveis médios esperados para ratos sadios de mesma idade. Os valores encontrados estão representados nas tabelas 1, 2, 3 e 4, e figuras 6, 7, 8 e 9, com as respectivas análises estatísticas e comentários.

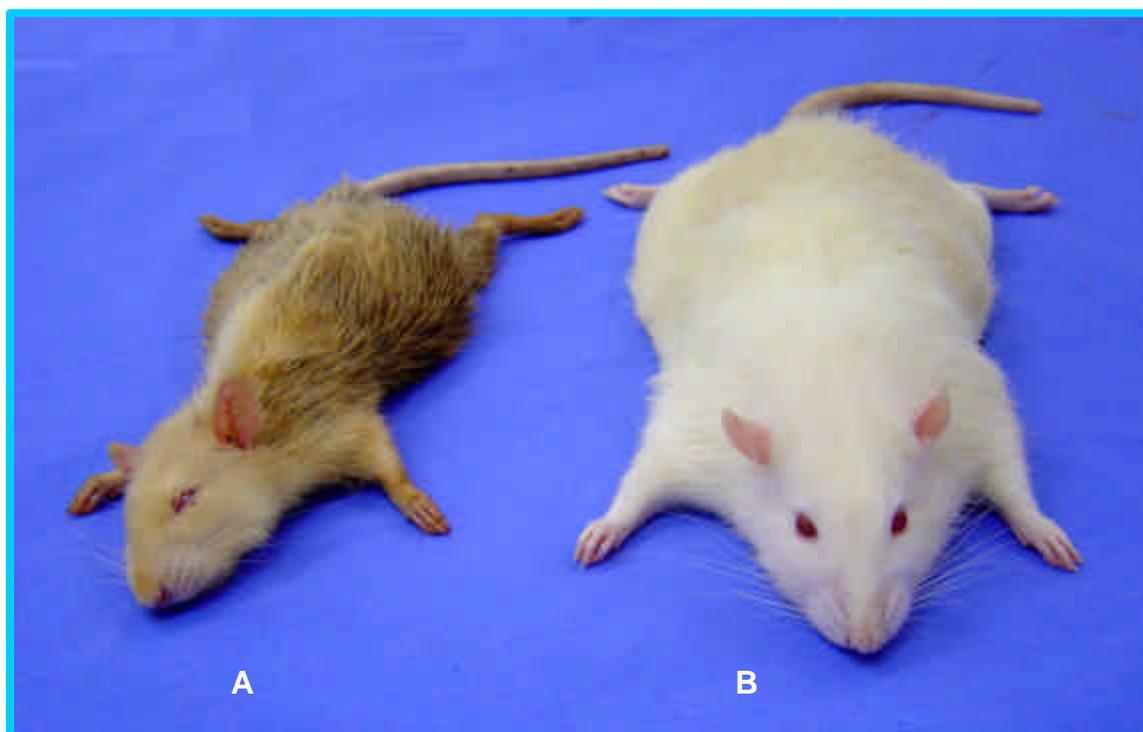
### **2.2. Grupo Diabético (G2)**

Os 20 animais que compuseram o grupo diabético evoluíram com parâmetros clínicos e laboratoriais compatíveis com diabetes graves. Esses animais apresentaram, ao longo do seguimento, progressiva queda do estado geral, perda inicial de peso após a indução e ganho significativamente menor de peso em relação aos ratos normais, com declínio progressivo da curva ponderal próximo ao sacrifício (Figura 4A). Também observamos episódios freqüentes de pneumonia associada à caquexia, as quais levaram ao óbito, dez animais durante o seguimento de 12 meses.

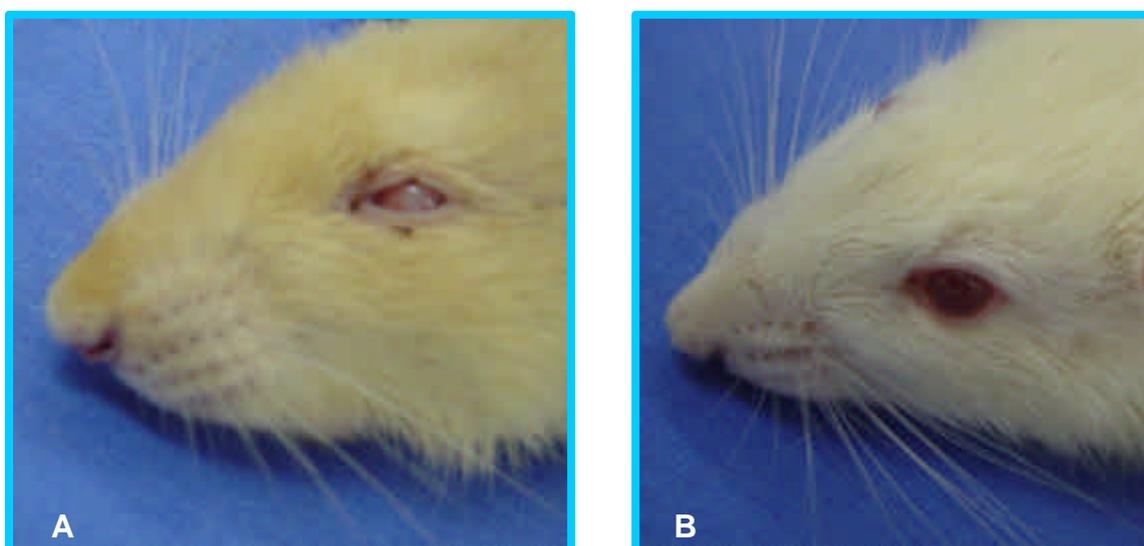
Também neste grupo de animais diabéticos foram observados: alteração da pelagem, aumento da circunferência abdominal (devido ao intestino grosso distendido e palpável), catarata bilateral (Figura 5A) e episódios freqüentes de pediculose e piodermite. Estas últimas controladas, respectivamente, com banhos de dimetilciclopropano carboxilato (Butox-P)<sup>9</sup>, diluído em solução aquosa na proporção de 1/6.000 ml e higiene local das feridas, com gaze embebida em solução fisiológica. A medida da ingestão alimentar, obtida por meio da subtração entre a pesagem do alimento oferecido e o alimento restante na gaiola, ao final de 12 horas, foi maior no Grupo Diabético com diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma, a ingestão hídrica e a diurese de animais diabéticos apresentaram valores significativamente elevados, quando comparadas com ratos normais de mesma idade de sacrifício. Os valores encontrados estão representados nas tabelas 1, 2, 3 e 4 e figuras 6, 7, 8 e 9, com as respectivas análises estatísticas e comentários.

---

<sup>9</sup> Quimio S.A.



**Figura 4.** Ratos com 12 meses de seguimento. Note a debilidade, caquexia e alteração da pelagem de um animal diabético (A), quando comparado à vitalidade de um animal normal de mesma idade (B).

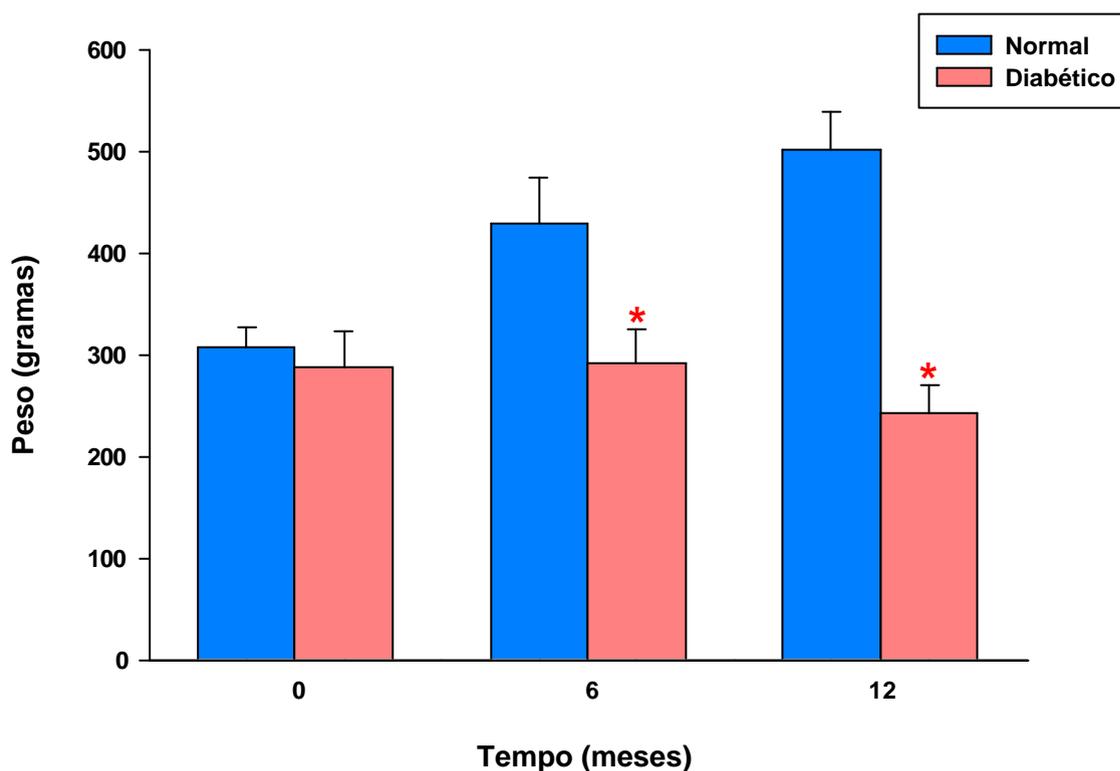


**Figura 5.** Ratos com 12 meses de seguimento. Detalhe do olho de um animal diabético com catarata (A) e de um animal normal, sem lesão (B).

**Tabela 1** - Médias e desvios-padrão do peso, em gramas, de animais dos grupos normal e diabético, nos momentos inicial (IN), 6<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> mês de seguimento, com a respectiva análise estatística.

Grupos	Peso (gramas)			Estatística
	0 (IN)	6 m	12 m	
<b>Normal G1</b>	307,5 ± 20,6 Aa	429,5 ± 44,4 Ba	501,5 ± 37,3 Ca	p < 0,001; IN < 6m < 12m
<b>Diabético G2</b>	288,5 ± 35,4 Aa	292,5 ± 33,6 Ab	244,0 ± 25,7 Bb	p = 0,003; (IN = 6m) > 12m

**Comentários:** A comparação entre os grupos mostrou que o G2 teve média de peso inferior ao grupo normal no 6<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> mês. Em G2 ocorreu estabilização do ganho ponderal até o 6<sup>o</sup> mês, com declínio até o sacrifício.



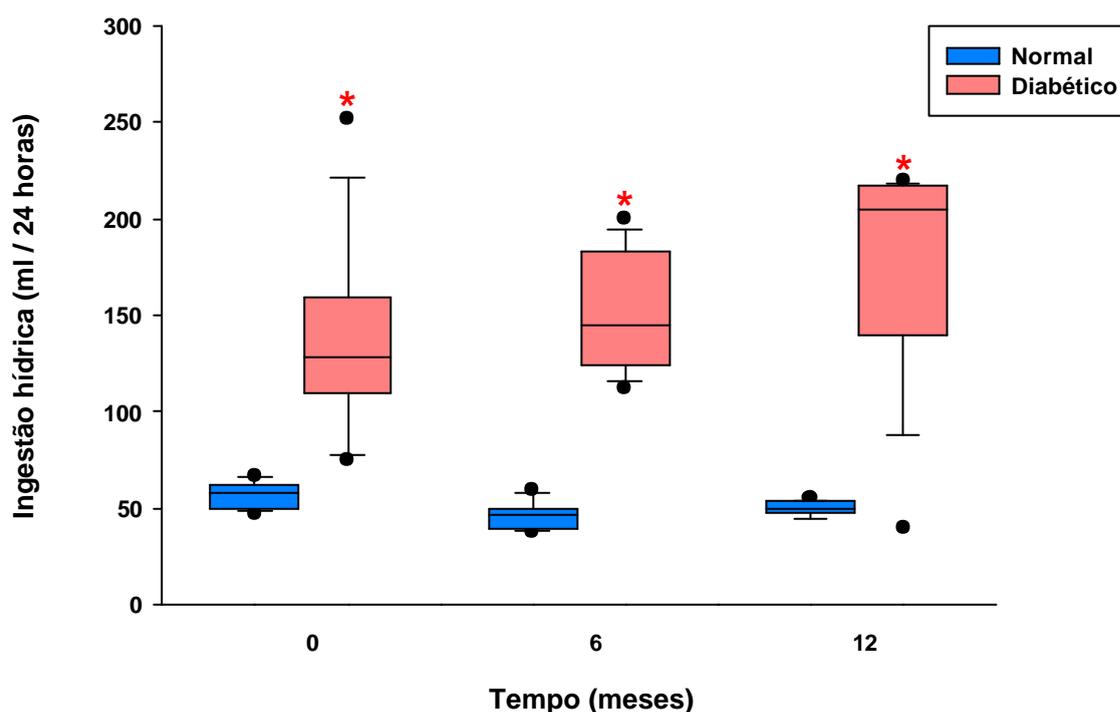
**Figura 6:** Média do peso (em gramas) em ratos normais (10 animais) e diabéticos (10 animais), no início do estudo e após 6 e 12 meses de seguimento.

(\*) Estatística: p < 0,001.

**Tabela 2** - Medianas e amplitudes semi-interquartílicas da ingestão hídrica em ml/24horas dos animais dos grupos normal e diabético, no momento inicial (IN), 6º e 12º mês de seguimento, com a respectiva análise estatística.

Grupos	Ingestão hídrica (ml/24 horas)			Estatística
	0 (IN)	6 m	12 m	
<b>Normal</b> G1	58,5 (6,0) Aa	47,0 (5,0) Ba	49,5 (3,0) Ba	p = 0,016; IN > (6m = 12m)
<b>Diabético</b> G2	128,5 (24,5) Ab	145,0 (29,5) Ab	205,0 (38,5) Ab	

**Comentários:** O grupo diabético (G2) apresentou valores da ingestão hídrica significativamente elevados em todos os momentos de avaliação, quando comparados com os apresentados pelo grupo normal (G1).

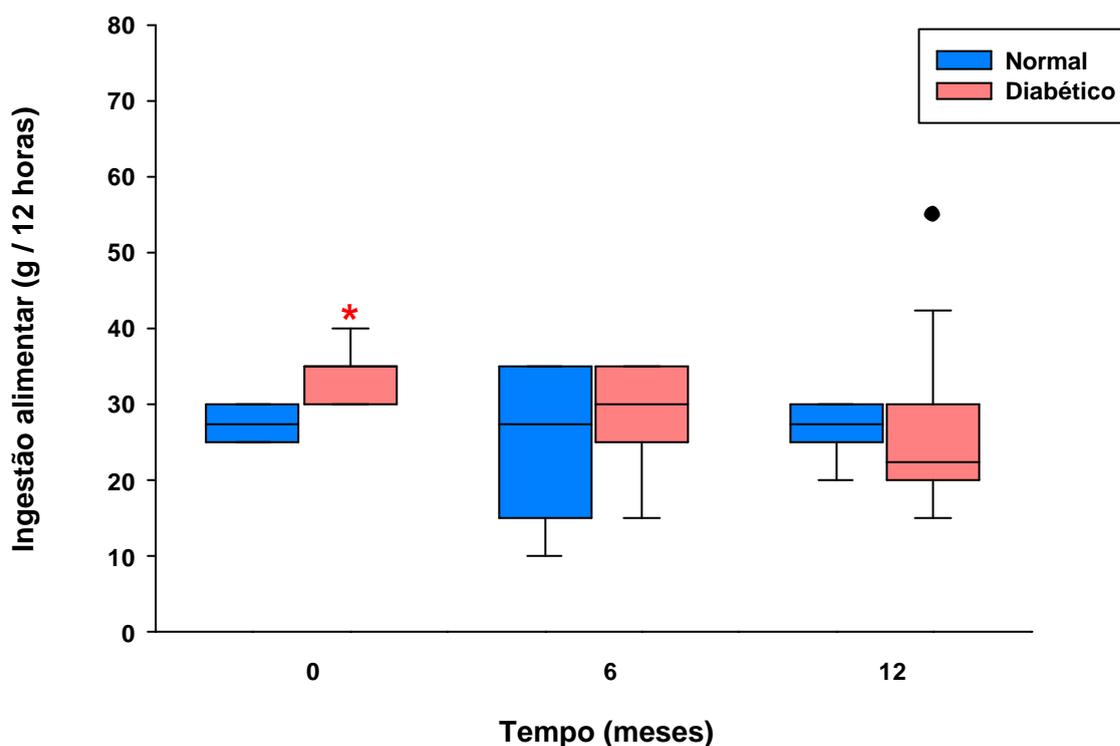


**Figura 7:** Box plot representando a dosagem da ingestão hídrica (ml/24 horas) em ratos normais (10 animais) e diabéticos (10 animais), no início do estudo e após 6 e 12 meses de seguimento. No box plot, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística: p < 0,005.

**Tabela 3** - Medianas e amplitudes semi-interquartílicas da ingestão alimentar em g/12horas dos animais do grupo normal e diabético, nos momentos inicial (IN), 6º e 12º mês de seguimento, com a respectiva análise estatística.

Grupos	Ingestão alimentar (g/12 horas)			Estatística
	0 (IN)	6 m	12 m	
Normal G1	27,5 (2,5) Aa	27,5 (10,0) Aa	27,5 (2,5) Aa	p = 0,942; IN = 6m = 12M
Diabético G2	35,0 (2,5) Ab	30,0 (5,0) Ba	22,5 (5,0) Ba	p = 0,016; IN > (6m = 12m)

**Comentários:** A ingestão de alimentos em G2 foi significativamente maior somente no momento inicial. Os comportamentos entre os grupos só evidenciaram diferenças estatísticas apenas no momento inicial.

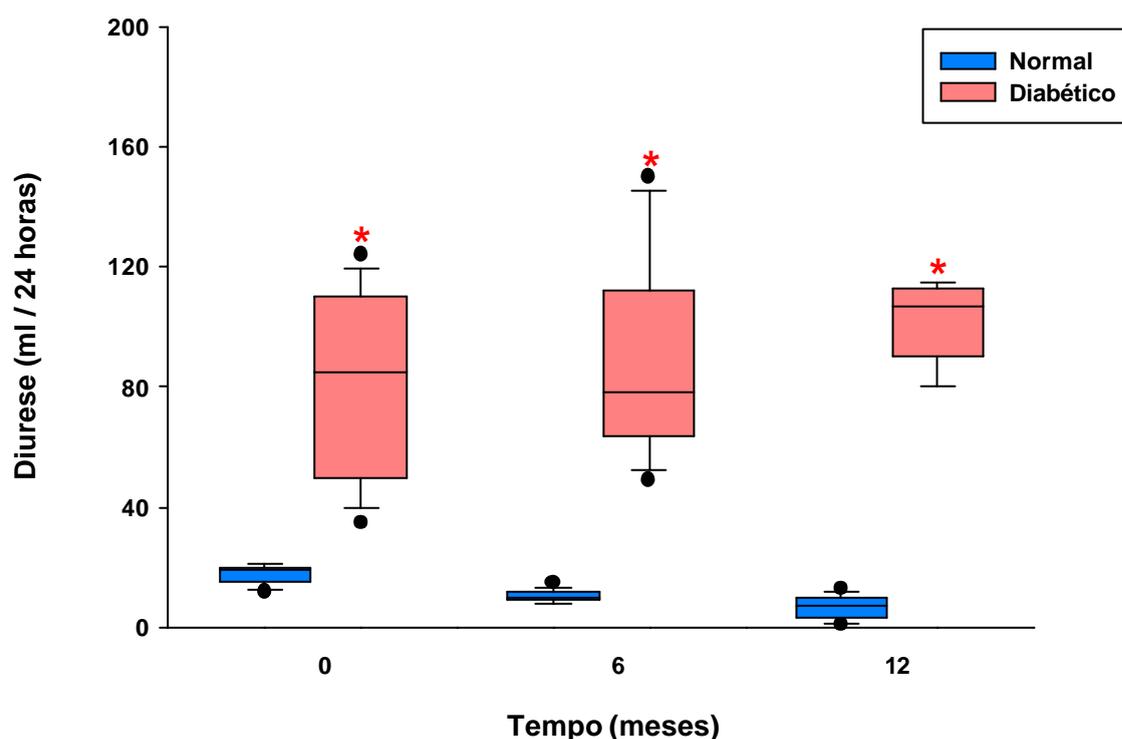


**Figura 8:** *Box plot* representando a dosagem da ingestão alimentar (g/12 horas) em ratos normais (10 animais) e diabéticos (10 animais), no início do estudo e após 6 e 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística: p = 0,003.

**Tabela 4** - Medianas e amplitudes semi-interquartílicas da diurese em ml/24horas dos animais dos grupos normal e diabético, nos momentos inicial (IN), 6º e 12º mês de seguimento, com a respectiva análise estatística.

Grupos	Diurese (ml/24 horas)			Estatística
	0 (IN)	6 m	12 m	
<b>Normal G1</b>	19,5 (2,5) Aa	10,0 (1,5) Ba	7,0 (3,5) Ba	p < 0,001; IN > (6m = 12m)
<b>Diabético G2</b>	85,0 (30,0) Ab	78,5 (24,0) Ab	107,0 (11,5) Ab	

**Comentários:** A diurese nos animais diabéticos (G2) manteve-se significativamente mais elevada que no grupo normal (G1), ao longo de todo o experimento.



**Figura 9:** Box plot representando a dosagem da diurese (ml/24 horas) em ratos normais (10 animais) e diabéticos (10 animais), no início do estudo e após 6 e 12 meses de seguimento. No box plot, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística: p < 0,001.

### **3. Exames Laboratoriais**

#### **3.1. Grupo Normal (G1)**

Os dados relativos à dosagem da glicemia de jejum, da glicose urinária e proteinúria dos dez animais acompanhados neste grupo, durante o período de um ano, constam das tabelas 5 e 6 e figuras 10, 11 e 12, juntamente com os seus respectivos comentários estatísticos.

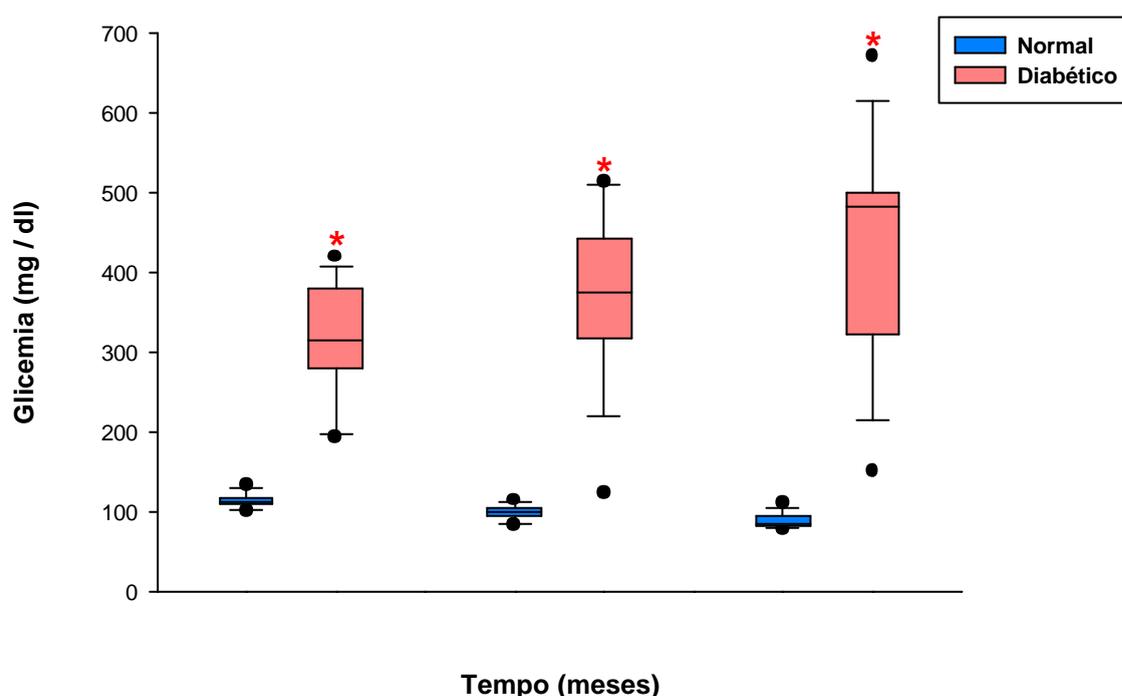
#### **3.2. Grupo Diabético (G2)**

Neste grupo, todos os animais acompanhados apresentaram alterações laboratoriais representadas por glicemia de jejum acima de 300 mg/dl, glicose urinária superior ou igual a 3.000 mg/dl e proteinúria. Esses parâmetros foram compatíveis com o estado diabético grave, tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o Grupo Normal (G1). Os dados referentes a esses achados encontram-se nas tabelas 5 e 6 e figuras 10, 11 e 12 juntamente com as análises estatísticas e comentários.

**Tabela 5** - Medianas e amplitudes semi-interquartílicas da glicemia em mg/dl dos animais dos grupos normal e diabético, nos momentos inicial (IN), 6<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> mês de seguimento, com a respectiva análise estatística.

Grupos	Glicemia (mg/dl)			Estatística
	0 (IN)	6 m	12 m	
<b>Normal G1</b>	113,5 (4,5) <b>Aa</b>	100,0 (4,5) <b>Ba</b>	86,0 (7,0) <b>Ca</b>	p < 0,001; IN > 6m > 12m
<b>Diabético G2</b>	316,0 (50,0) <b>Ab</b>	377,0 (63,0) <b>Ab</b>	483,0 (89,0) <b>Ab</b>	p = 0,059; IN = 6m = 12m

**Comentários:** No grupo normal (G1), os níveis glicêmicos mantiveram-se dentro dos limites de normalidade para a espécie. O grupo diabético (G2) apresentou valores glicêmicos significativamente superiores ao grupo normal (G1) durante todo o experimento.

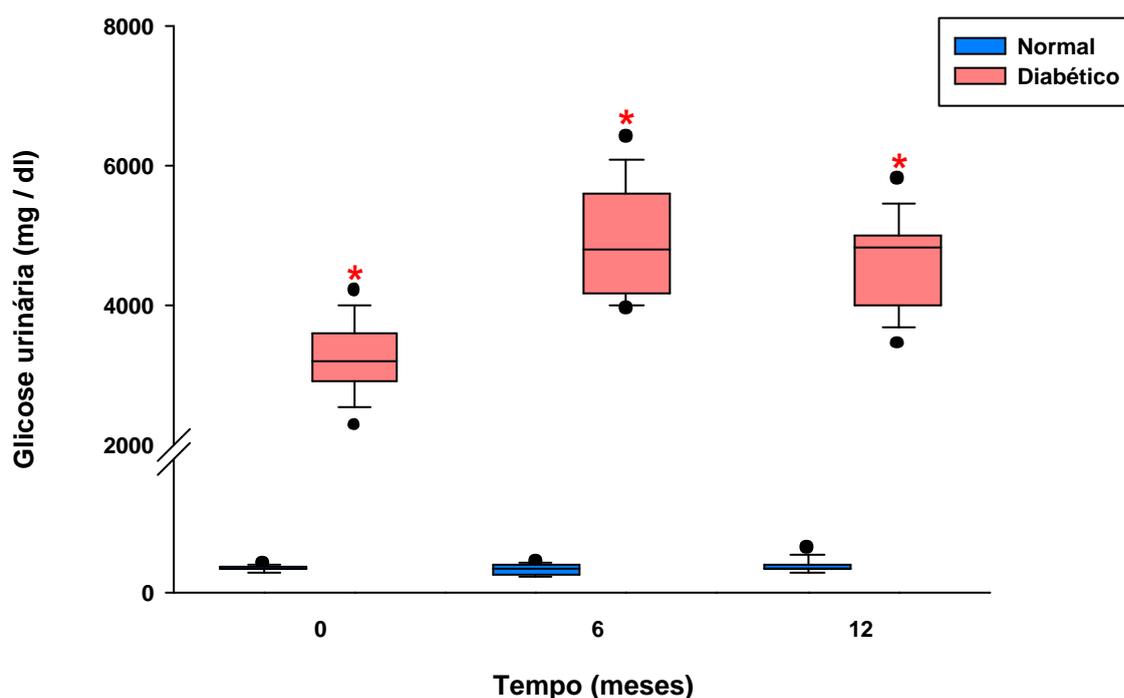


**Figura 10:** *Box plot* representando a dosagem da glicemia (ml/dl) em ratos normais (10 animais) e diabéticos (10 animais), no início do estudo e após 6 e 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística: p < 0,001.

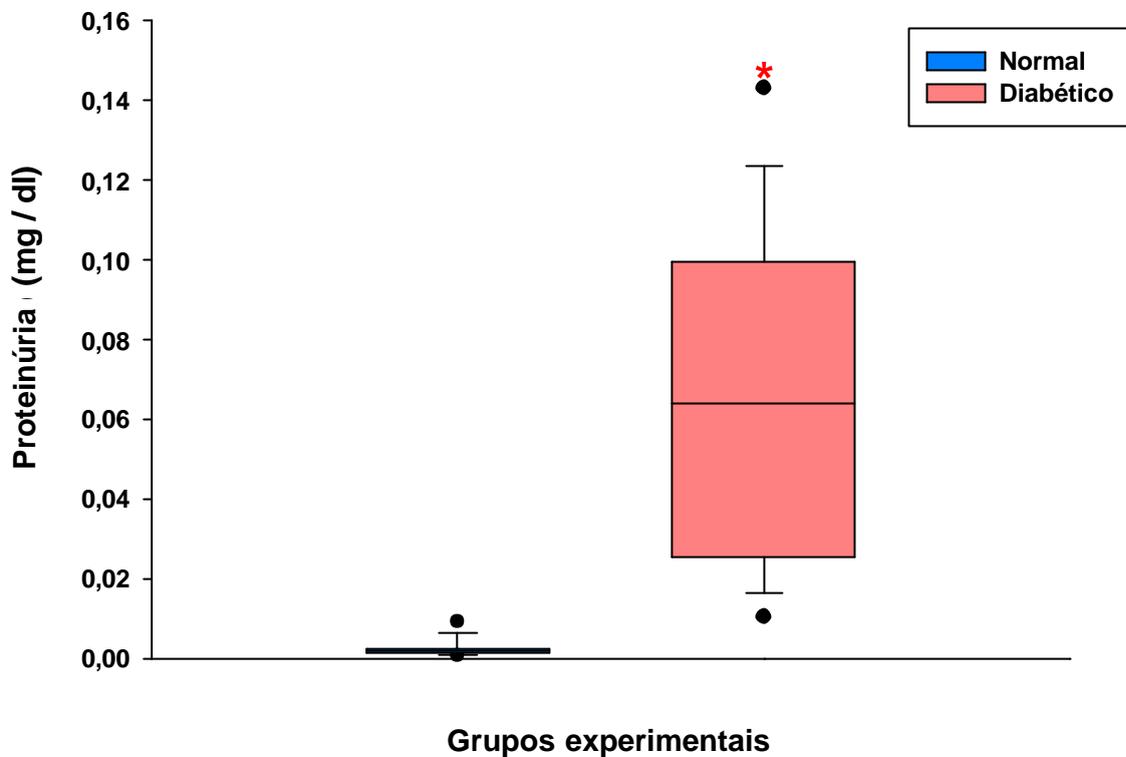
**Tabela 6** - Medianas e amplitudes semi-interquartílicas da glicose urinária em mg/dl dos animais dos grupos normal e diabético, nos momentos inicial (IN), 6º e 12º mês de seguimento, com a respectiva análise estatística.

Grupos	Glicose urinária (mg/dl)			Estatística
	0 (IN)	6 m	12 m	
Normal G1	9,0 (0,5) Aa	9,0 (1,0) Aa	9,5 (1,0) Aa	p = 0,627; IN = 6m = 12m
Diabético G2	3.212,0 (342,5)Ab	4.789,0 (709,5)Bb	4.283,0 (495,0)Bb	p < 0,001; IN < (6m = 12m)

**Comentários:** Os valores da glicose urinária no grupo normal mantiveram-se constantes durante a progressão dos momentos e significativamente inferiores em relação ao grupo diabético, o qual apresentou níveis estatisticamente elevados.



**Figura 11:** Box plot representando a dosagem de glicose urinária (ml/24 horas) em ratos normais (10 animais) e diabéticos (10 animais), no início do estudo e após 6 e 12 meses de seguimento. No box plot, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística: p < 0,001.

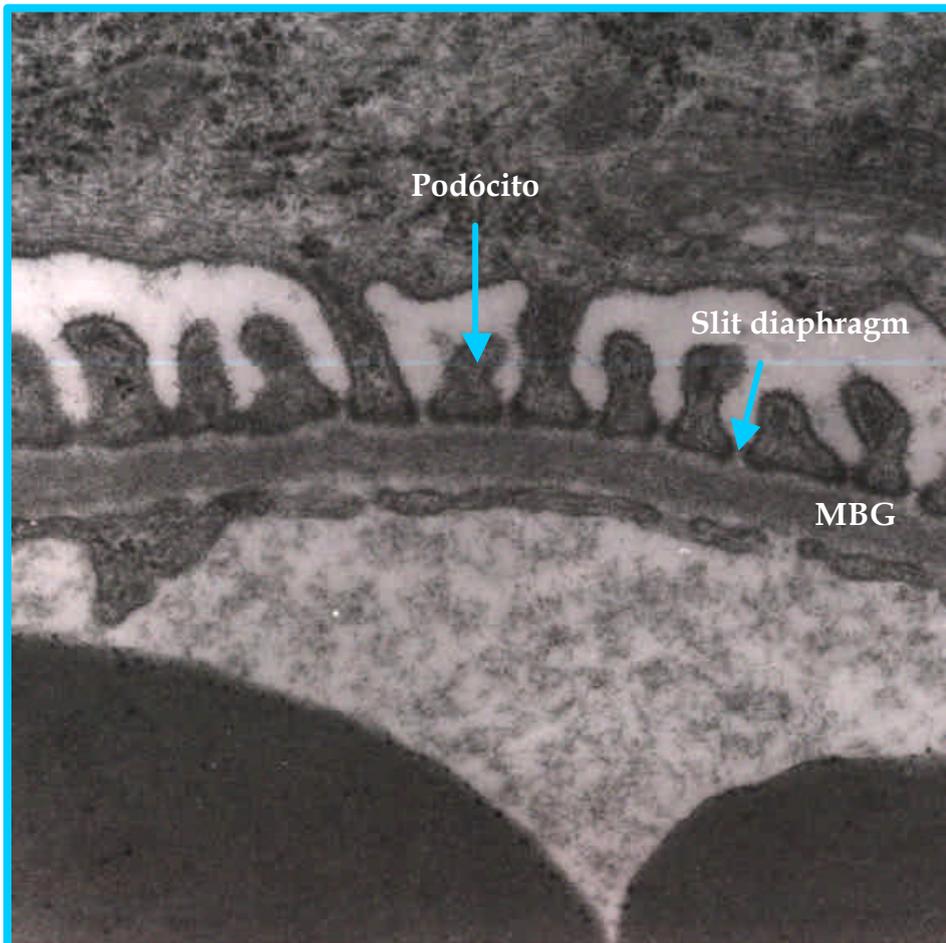


**Figura 12:** *Box plot* representando a dosagem de proteína urinária (mg/dl) em ratos Wistar normais (10 animais) e diabéticos (10 animais) após 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística:  $p < 0,001$ .

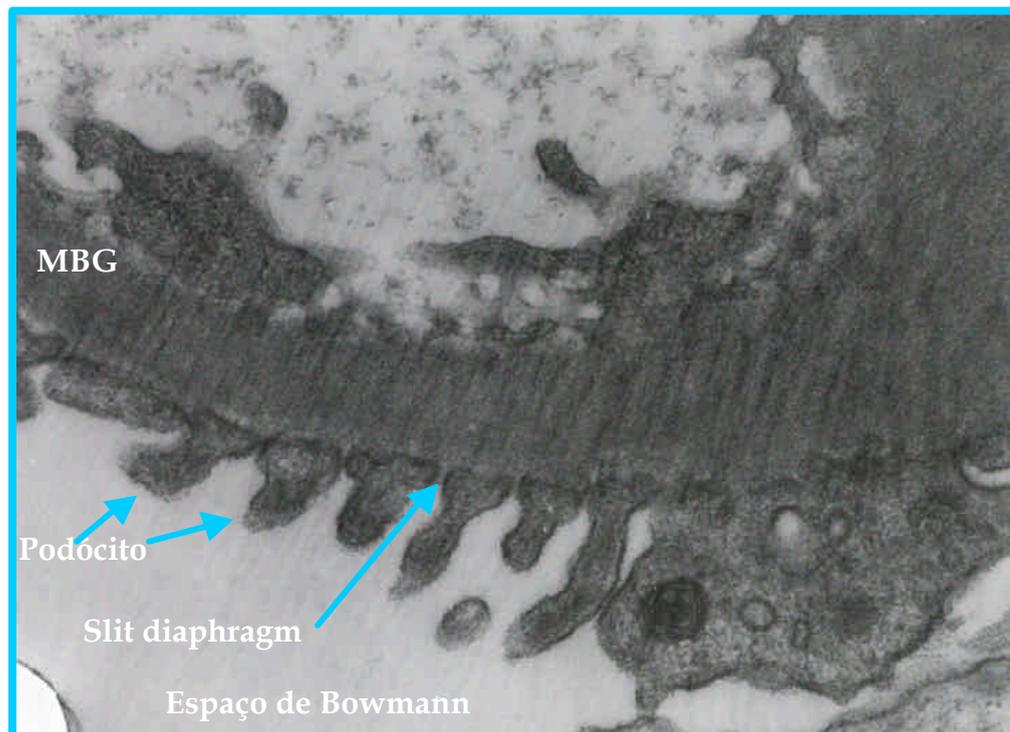
**Comentário:** As medianas da proteinúria obtidas no grupo diabético após 12 meses de seguimento apresentam valores muito elevados e estatisticamente significativos para  $p < 0,001$  em relação ao grupo normal.

#### 4. Análise morfométrica

Nas figuras 13 e 14 estão representadas as elétron-micrografias do grupo normal e diabético respectivamente, nas quais observa-se a MBG, os podócitos e os “slit diaphragm”.



**Figura 13.** Elétron-micrografia de glomérulo normal; notamos MBG não espessada e um número de podócitos e de “slit diaphragm” maior que o observado em ratos diabéticos (figura 14). Aumento de 42.000 vezes.

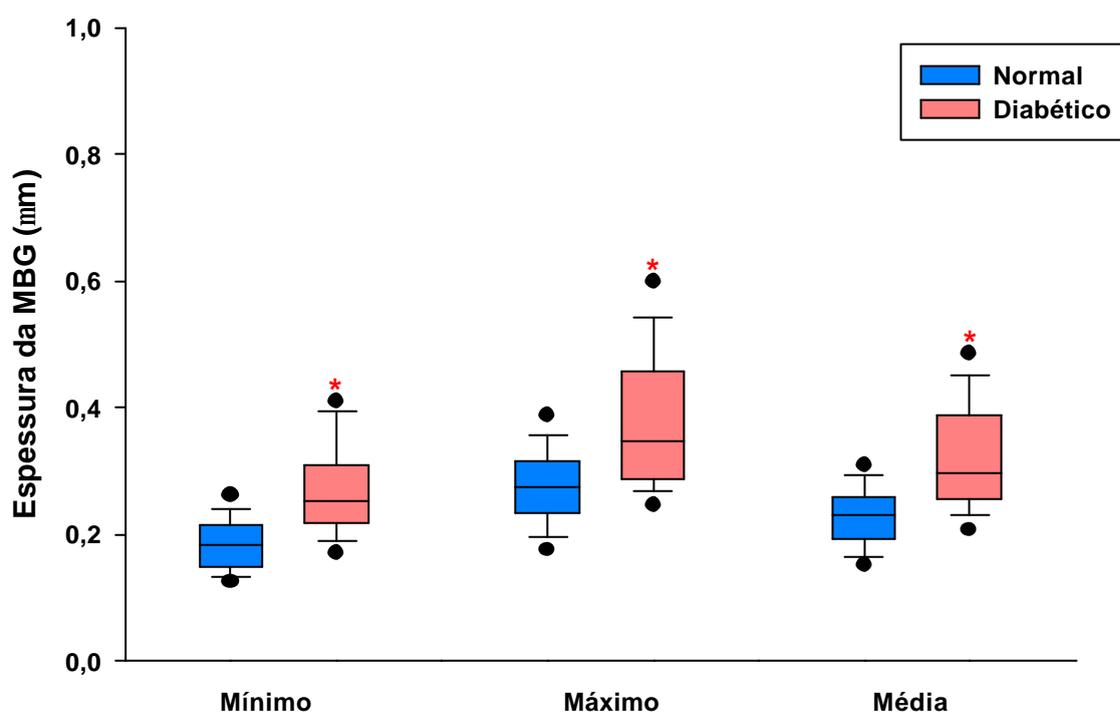


**Figura 14.** Elétron-micrografia de glomérulo diabético; notamos espessamento da MBG e menor número de podócitos e de “slit diaphragm” por 2,5 $\mu$ m. Aumento de 42.000 vezes.

Os valores obtidos no estudo morfométrico da espessura da MBG, número de podócitos, número de “slit diaphragm” e extensão dos “slit diaphragm” de animais normais e diabéticos com 12 meses de seguimento, com os comentários da análise estatística constam, respectivamente, das figuras 15,16,17 e 18

#### 4.1. Espessura da Membrana Basal Glomerular (MBG) em micrômetros ( $\mu\text{m}$ )

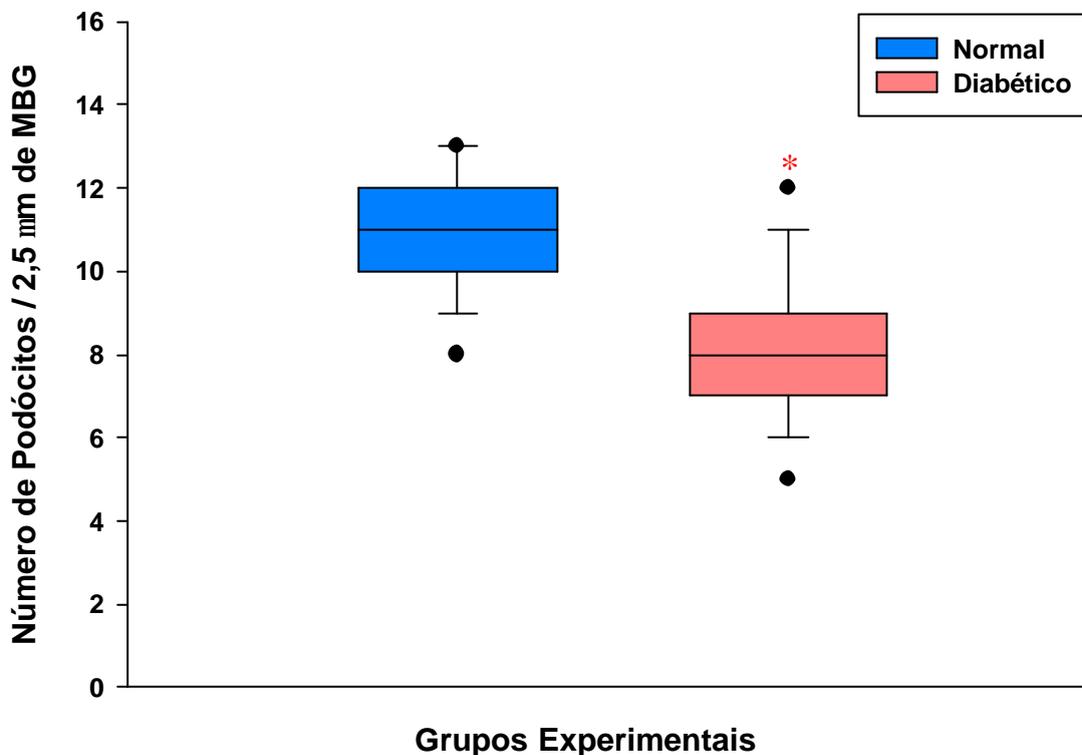
No gráfico da figura 15, representamos as medianas dos valores mínimos, máximos e médios, obtidos pela análise morfométrica da espessura da MBG, em 8 glomérulos de cada animal, num total de 4 ratos normais e 4 ratos diabéticos, escolhidos ao acaso. Observa-se um espessamento da MBG significativamente maior no grupo diabético em relação ao grupo normal para  $p < 0,001$ .



**Figura 15.** *Box plot* representando a espessura média ( $\mu\text{m}$ ) da membrana basal glomerular (MBG) em ratos normais (4 animais, 115 elétrons-micrografias) e diabéticos (4 animais, 136 elétrons-micrografias), com 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística:  $p < 0,001$ .

## 4.2. Número de podócitos por 2,5 $\mu$ m de MBG

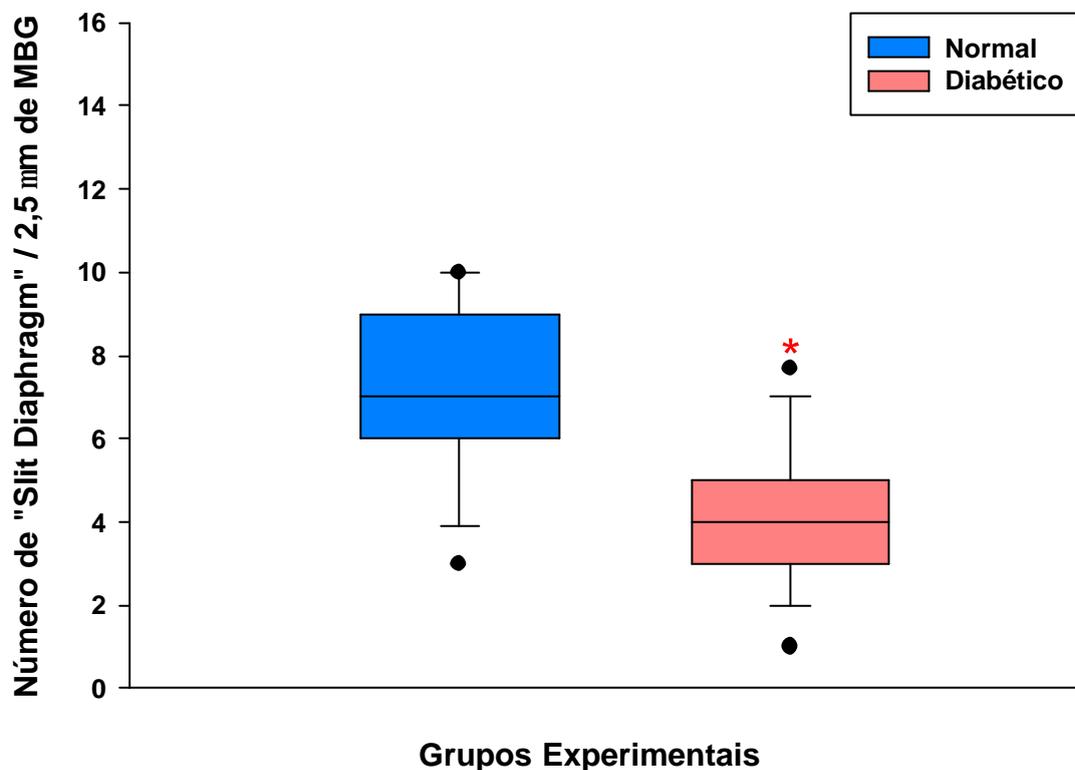
No gráfico da figura 16, representamos o número de podócitos obtidos pela análise morfológica das elétrono-micrografias, em 8 glomérulos de cada animal, num total de 4 ratos normais e 4 ratos diabéticos, escolhidos ao acaso. Observa-se um número significativamente menor de podócitos no grupo diabético em relação ao grupo normal para  $p < 0,001$ .



**Figura 16.** *Box plot* representando o número de podócitos em 2,5  $\mu$ m de membrana basal glomerular (MBG) em ratos normais (4 animais, 115 elétrono-micrografias) e diabéticos (4 animais, 136 elétrono-micrografias), com 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística:  $p < 0,001$ .

### 4.3. Número de “slit diaphragm” por 2,5 $\mu$ m de MBG

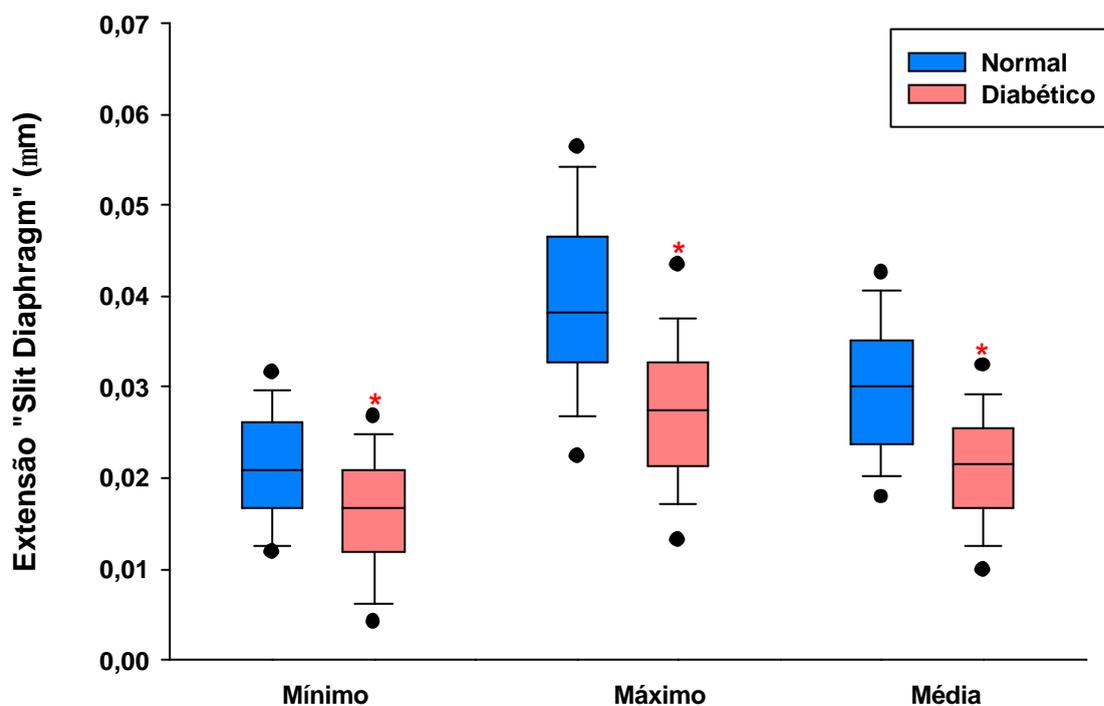
No gráfico da figura 17, representamos o número de “slit diaphragm” obtidos pela análise morfológica das elétrono-micrografias, em 8 glomérulos de cada animal, num total de 4 ratos normais e 4 ratos diabéticos, escolhidos ao acaso. Observa-se um número significativamente menor de “slit diaphragm” no grupo diabético em relação ao grupo normal para  $p < 0,001$ .



**Figura 17.** *Box plot* representando o número de “slit diaphragm” em 2,5  $\mu$ m de membrana basal glomerular (MBG) em ratos normais (4 animais, 115 elétrono-micrografias) e diabéticos (4 animais, 136 elétrono-micrografias), com 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística:  $p < 0,001$ .

#### 4.4. Extensão dos “slit diaphragm” em $\mu\text{m}$

No gráfico da figura 18, representamos as medianas dos valores mínimos, máximos e médios, obtidos pela análise morfológica da extensão dos “slit diaphragm” em  $\mu\text{m}$ , em 8 glomérulos de cada animal, num total de 4 ratos normais e 4 ratos diabéticos, escolhidos ao acaso. Observa-se que a extensão dos “slit diaphragm” no grupo normal em relação ao grupo diabético, foi significativamente maior para  $p < 0,001$ .



**Figura 18.** *Box plot* representando a extensão dos “Slit diaphragm” ( $\mu\text{m}$ ) da membrana basal glomerular (MBG) em ratos normais (4 animais, 115 elétrón-micrografias) e diabéticos (4 animais, 136 elétrón-micrografias), com 12 meses de seguimento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal, a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os percentis 5 e 95. (\*) Estatística:  $p < 0,001$ .

---

## Discussão

## 1. Quanto aos Animais Utilizados

Utilizamos ratos (*Rattus wistar*) como animais de experimentação, por apresentarem inúmeras vantagens em relação ao cão e a outros animais de maior porte: a) fácil manuseio (alimentação, higiene, acomodação); b) possibilidade de trabalhar simultaneamente com vários grupos experimentais, sem a ocupação de grandes espaços; c) elevada resistência à infecção; d) facilidade para remoção do órgão estudado (rim); e) redução de gastos com o projeto. Além desses fatos, os ratos apresentam semelhanças clínicas, laboratoriais e histopatológicas com o diabetes humano, sendo os modelos experimentais de diabetes induzidos no rato amplamente utilizados por pesquisadores em todo o mundo<sup>33,34,35,36,37,38,39,40,55,56,57</sup>.

## 2. Quanto ao Tempo de Observação dos Animais

O diabetes é uma doença crônica, cujas manifestações patológicas sobre os rins estão nitidamente relacionadas ao tempo de exposição do hospedeiro às anormalidades metabólicas causadas pela doença<sup>14</sup>.

Por esta razão, optou-se pelo seguimento em longo prazo dos animais, nos dois grupos experimentais, por 12 meses; período esse que se demonstrou suficientemente capaz de produzir as alterações orgânicas de interesse ao nosso estudo.

### 3. Quanto às Técnicas Utilizadas

#### 3.1. Anestesia

Para a retirada dos órgãos e posterior sacrifício do animal, foi utilizado, como agente anestésico, o pentobarbital sódico, administrado no quadrante inferior esquerdo do abdome, por via intraperitoneal, na dosagem de 30 mg/kg de peso corporal. Essa opção foi motivada pelos seguintes fatores: a) facilidade na indução anestésica; b) bom plano anestésico, não havendo nenhuma reação de dor por parte do animal; c) baixo custo; d) maior disponibilidade em relação aos outros agentes anestésicos. Em adição a estes fatos, esse tipo de anestesia acha-se perfeitamente padronizado em nosso laboratório experimental, tendo sido comprovadamente eficaz em vários estudos<sup>38,39,40,58</sup>.

#### 3.2. Indução do Diabetes Experimental

O Diabetes experimental pode ser induzido em animais, por vários mecanismos. Infelizmente, porém, em grande número de métodos, o agente utilizado não é capaz de desenvolver a maior parte da fisiopatologia do diabetes humano<sup>14</sup>. Os principais mecanismos de produção de diabetes são: estresse, infecções, toxinas, ou manipulações, incluindo a pancreatectomia<sup>59</sup>; lesões do sistema nervoso central<sup>60</sup>; uso de hormônios anti-insulínicos<sup>14</sup>; exposição à hidrocortisona ou ACTH<sup>61,62</sup>; indução por vírus<sup>63</sup> e o uso de agentes químicos beta-citotóxicos<sup>64,65</sup>.

A pancreatectomia total consiste em método clássico de obtenção de diabetes experimental<sup>59</sup>. A ressecção parcial do

pâncreas também produz diabetes, cujos aspectos clínico-laboratoriais se assemelham ao diabetes quimicamente induzido pela aloxana<sup>12</sup>. A utilização desses métodos de ressecção, entretanto, tem sido restrita principalmente a animais de maior porte, além de incorrer necessariamente num procedimento cirúrgico adicional, com todas as suas implicações.

As lesões hipotalâmicas podem causar obesidade em animais e humanos, acompanhada de *Diabetes Mellitus* proporcional ao ganho de peso<sup>60,66</sup>. Ratos adultos sujeitos a lesões do núcleo ventrículo-medial do hipotálamo, tornam-se obesos, hiperglicêmicos, hipoinsulinêmicos e insulino-resistentes<sup>67</sup>; estudos dessa natureza, contudo, além de terem uma fisiopatologia diversa do diabetes insulino-dependente, certamente implicariam em uma maior complexidade de execução e o conhecimento aprofundado de neurofisiologia, o que fugiria completamente aos nossos objetivos.

A utilização de hormônios com efeitos antagônicos à insulina, incluindo a epinefrina, o glucagon, os glicocorticóides e o hormônio de crescimento, ainda que capazes de produzir hiperglicemia, como na resposta fisiológica ao estresse, ou em certas condições patológicas (tumores, distúrbios metabólicos), tem seus efeitos discutíveis em animais<sup>14</sup>, exercendo, principalmente no caso da epinefrina e do glucagon, um efeito anti-insulínico, somente se administrados em altas doses.

Vários estudos têm reportado a indução de hiperglicemia e hiperplasia das células beta em camundongos,<sup>68</sup> ratos<sup>61,69</sup>, coelhos<sup>62,70</sup>, cobaios<sup>71</sup> e macacos<sup>72</sup> por meio da exposição à hidrocortisona e ACTH. Os eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos do diabetes, assim induzido, são, contudo, muito variáveis, o que comprometeria nossa avaliação.

A utilização de modelos virais para o diabetes experimental, relacionados aos vírus RNA<sup>63</sup>, altamente espécie-específicos, além de se constituir em risco potencial para o experimentador, tem ainda papel incerto na patogênese da doença.

Sendo assim, optamos por métodos químicos de supressão endócrina do pâncreas, os quais exibem todos os eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabetogênico<sup>14</sup>.

A aloxana e a estreptozotocina são os dois agentes químicos, com citotoxicidade específica para as células beta, mais estudados. Essas drogas causam insuficiência insulínica primária do pâncreas, provocando uma resposta trifásica nos níveis glicêmicos durante as primeiras horas da administração, seguida do estabelecimento de diabetes permanente nas 24 horas subsequentes<sup>13,14</sup>.

Esses métodos químicos, apesar de terem um elevado índice de mortalidade relativa, são de fácil execução e permitem a utilização de um grande número de animais, destruindo a parte endócrina do pâncreas, com preservação de sua função exócrina, tendo, ainda, a vantagem de estarem padronizados em nosso laboratório experimental.

Utilizamos a aloxana por via endovenosa, cuja atividade diabetogênica foi inicialmente notada por Dunn *et al*<sup>64</sup>, quando estudava os efeitos do ácido úrico e seus derivados na produção da lesão renal em coelhos.

Essa opção permaneceu, apesar da maior especificidade da estreptozotocina sobre as células beta, com sua ação vinculada à dose de administração e com menor toxicidade geral que a aloxana,

a qual exhibe estreita margem de segurança entre as doses diabetogênicas e letais<sup>73,74</sup>.

Duas razões nos levaram a essa escolha: a primeira, de ordem econômica, dado o alto custo da estreptozotocina, quando comparado com o da aloxana, cujos estoques estavam mais disponíveis em nosso laboratório experimental; a segunda, pelo uso amplamente difundido da aloxana na produção de diabetes experimental por inúmeros serviços de larga experiência no assunto<sup>56,57</sup>, incluindo a nossa unidade<sup>31,32,33,34,36,38,39,40,58,75,76</sup>.

A aloxana administrada por via endovenosa, na dose de 42 mg/kg de peso corporal<sup>12,75,77</sup>, produziu em nossos animais diabetes franco, com o desenvolvimento de alterações clínicas, laboratoriais, funcionais e histopatológicas bem definidas, incluindo, respectivamente, elevação da ingestão hídrica e da diurese, valores glicêmicos acima de 300 mg/dl e glicose urinária maior que 3000 mg/dl.

Em nosso estudo, dos 50 animais submetidos à injeção endovenosa de aloxana, dez ratos (20%) não ficaram diabéticos ou apresentaram diabetes de gravidade leve ou moderada, sendo desprezados. Dos 40 animais restantes, 20 ratos (40% do total) morreram durante a primeira semana após a indução, tendo a mortalidade maior ocorrido nas primeiras 72 horas do experimento, e, finalmente, 20 ratos (40%) desenvolveram diabetes grave, tendo sido colocados em seguimento, no período de 12 meses; tivemos 50% de mortalidade no seguimento tardio, concluindo nosso estudo com dez animais diabéticos.

Esses resultados são, em parte discordantes dos relatados por Calderon<sup>76</sup>, cujos estudos em ratas não tratadas com diabetes aloxânico, demonstraram uma porcentagem de 50% de

animais diabéticos, 32,5% de animais normais e um índice de mortalidade de 17,5%, até o 15º dia após a indução. Este índice diabetogênico aparentemente elevado (50%) explica-se, no entanto, em razão dos critérios de classificação do diabetes utilizado pela autora, a qual considerou diabéticos animais com glicemia superior ou igual a 120 mg/dl. Se considerarmos apenas os ratos cujos valores glicêmicos foram superiores a 200 mg/dl, sendo essa a sistemática por nós utilizada, observamos que o seu percentual de ratos diabéticos graves foi de 37,5%, valores muito próximos aos por nós obtidos.

Em relação à taxa de mortalidade na indução, obtivemos, em nossa pesquisa, um índice da ordem de 40%. Lukens<sup>12</sup>, em extensa revisão da literatura a respeito da ação da aloxana sobre animais de várias espécies, incluindo o rato, o cão, o coelho, o macaco, o gato, mostrou índices muito variáveis de mortalidade, oscilando entre 33 e 100%, na mesma espécie. Essas cifras amplas estão ligadas a múltiplos fatores capazes de mudar os efeitos da droga e a sensibilidade do hospedeiro, envolvendo desde o estado de hidratação da droga, a velocidade de infusão, a via de administração, a dieta, o tempo de jejum, o peso do animal e até a utilização de substâncias capazes de influenciar os seus mecanismos de ação, tais como os barbitúricos, o ácido nicotínico, o 1-2-dimetil-4-amino-5-benzeno, etc.). Os ratos, por exemplo, são mais sensíveis a uma dose constante de aloxana, após terem sido alimentados previamente com uma dieta de alto teor de gorduras. As taxas de mortalidade, nesses casos, alcançam 90 a 100%. Por outro lado, dietas pobres em gordura, com altas concentrações de proteínas e carboidratos, são capazes de diminuir esses índices para 33 a 40%.

O jejum também tem um papel importante na resposta das espécies à aloxana. Noventa e cinco por cento dos ratos tratados com aloxana, administrada com o animal em jejum prolongado de 48 a 60 horas, tornam-se diabéticos. A administração de uma dose similar de aloxana, quando o jejum não foi observado, diminui essa resposta para 25%.

Lukens<sup>12</sup>, revisando os trabalhos de vários autores, cita que animais que não respondem a uma primeira injeção de aloxana, podem ser refratários a injeções posteriores de doses similares. Nesse aspecto, os autores têm observado que os animais que apresentam este comportamento geralmente são do grupo em que o jejum não foi convenientemente observado. Esses mesmos animais, refratários às doses subseqüentes, tornam-se diabéticos após 60 horas de jejum, com uma dose padrão de aloxana.

Outro aspecto a considerar são as vias de administração da droga. A via endovenosa tem sido a de escolha na maioria das espécies animais, onde os efeitos da aloxana são mais evidentes<sup>77</sup>. As vias subcutânea e intraperitoneal também são satisfatórias no rato, enquanto que, no coelho, doses muito elevadas devem ser ministradas por essas vias, para que se atinja o mesmo efeito diabetogênico. Finalmente, a via oral é usualmente insatisfatória para a ação da aloxana, muito embora o diabetes possa ser produzido em ratos, coelhos e gatos, se a droga for rapidamente ingerida com comida, após um jejum prévio prolongado<sup>12</sup>.

Quando a via endovenosa é usada, a velocidade de infusão da droga é importante. Doses efetivas de aloxana não produzem diabetes se as mesmas são injetadas muito lentamente.

Lukens<sup>12</sup> demonstrou a importância do peso, em relação a susceptibilidade do animal aos efeitos tóxicos da aloxana. Em um

estudo detalhado em ratos, esse pesquisador revelou que a toxicidade da aloxana altera-se numa relação linear com o peso do animal, aumentando 0,73 poderes de toxicidade para cada unidade de peso. Essa fórmula foi utilizada para estabelecer a dose letal de aloxana para cada rato.

Finalmente, algumas substâncias têm efeito direto ou indireto sobre os mecanismos de ação da aloxana. Os barbitúricos tornam os animais mais sensíveis aos efeitos da droga. Por outro lado, algumas substâncias, tais como o ácido nicotínico, o 1-2-dimetil-4 amino-5-benzeno e o ácido dicarboxílico piridínico, podem proteger o animal desses danos, se administrados simultaneamente com a droga<sup>12</sup>.

#### **4. Quanto à Evolução Clínica**

O estudo clínico dos animais envolveu os seguintes parâmetros: estado geral, apetite, atividade, peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese.

No grupo normal (G1), os animais apresentaram-se, ao longo do experimento, em bom estado geral, ativos, com apetite normal, tônus e reflexos conservados. Todos os 10 animais desse grupo tiveram ganho progressivo de peso, com manutenção da ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, dentro dos padrões de normalidade para a espécie e em conformidade com outros trabalhos<sup>56,78</sup>.

O comportamento dos animais do grupo diabético (G2) foi completamente diferente do observado no grupo normal (G1), caracterizado por apatia, alterações da pelagem, odor forte da urina, anorexia e comprometimento acentuado e progressivo do estado

geral. O óbito pós-indução do diabetes aloxânico (até o 14<sup>o</sup> dia) ocorreu em 40% dos animais tratados (20 ratos). Essa taxa de mortalidade não difere dos índices relatados por Lukens<sup>12</sup>, numa extensa revisão de literatura sobre a aloxana.

Vinte por cento dos animais submetidos à indução de aloxana (dez ratos) não ficaram diabéticos ou desenvolveram a doença numa gravidade leve ou moderada, sendo excluídos da pesquisa. Vinte animais desenvolveram diabetes graves, caracterizado por declínio ponderal significativo, com aumentos relevantes da ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese em níveis estatisticamente significativos, quando comparados com o grupo normal (G1). A poliúria, uma das características do estado hiperglicêmico, ocorreu devido ao aumento da concentração de glicose no filtrado glomerular, excedendo a capacidade das células tubulares em reabsorvê-la, dando origem à diurese osmótica. Esse mecanismo tem sido o responsável pela produção de grande volume de urina com elevada osmolaridade<sup>79</sup>.

A polidipsia presente nos animais diabéticos deve-se à hiper-osmolaridade sangüínea, em razão de altos níveis de glicose circulante, que faz a água passar do meio intracelular para o extracelular, a fim de manter o equilíbrio osmótico. A desidratação intracelular é percebida pelos osmorreceptores cerebrais, desencadeando sede intensa<sup>80</sup>.

Essas alterações estiveram associadas, ainda, à debilidade geral, pouca atividade, queda de pelos, distensão abdominal, catarata bilateral e episódios freqüentes de pediculose e piodermites. Esses quadros foram relatados por Lee et al<sup>81,82</sup>, Orloff et al<sup>56</sup>, Ueda et al<sup>83</sup>, Brekke et al<sup>84</sup>, Macedo et al<sup>31</sup>, Calderon<sup>76</sup>,

Spadella<sup>36</sup>, Breim<sup>58</sup>, Lerco<sup>40</sup> e Lerco et al<sup>75</sup> em estudos com o diabetes induzido por aloxana ou pela estreptozocina.

Animais diabéticos graves também apresentaram uma alta taxa de mortalidade no seguimento tardio de 12 meses (50%), em decorrência de complicações metabólicas do diabetes, associadas principalmente, à infecção pulmonar e caquexia. Estas alterações também estão concordantes com vários estudos realizados, em longo prazo, por vários autores<sup>36,56,58,81,82</sup>.

## 5. Quanto aos Exames Laboratoriais

As dosagens de glicemia de jejum, glicose urinária e proteinúria observadas nos 10 animais do grupo normal (G1), mostraram-se dentro dos limites da normalidade para a espécie, durante o seguimento. Por outro lado, os 10 animais do grupo diabético (G2) evoluíram com parâmetros laboratoriais compatíveis com diabetes grave, em níveis estatisticamente significativos, como observamos em trabalhos anteriores de Orloff et al<sup>57</sup>; Ueda et al<sup>84</sup>, Macedo et al<sup>31,32,33</sup>, Spadella<sup>36</sup>, Macedo<sup>39</sup> e Lerco<sup>40</sup>.

A proteinúria observada nesse estudo mostrou resultados semelhantes aos obtidos por Weil et al<sup>45</sup>, o quais induziram diabetes em ratos com a estreptozotocina, e observaram esses animais por um período de 9 meses, verificando um aumento progressivo da proteinúria a partir do 4<sup>o</sup> mês. Mifsud et al<sup>47</sup>, estudando ratos diabéticos pela estreptozotocina, durante 6 meses, relataram significativa proteinúria nos animais diabéticos em relação ao grupo controle.

## 6. Quanto aos Parâmetros Histológicos - Estudo Morfométrico

### 6.1. Histopatologia Renal

O critério adotado nesta pesquisa para análises morfológicas e morfométricas do tecido renal de ratos normais e diabéticos foi baseado em um estudo realizado por Patrakka et al<sup>85</sup>, que analisaram biópsias renais de humanos, ao microscópio eletrônico, e estabeleceram o número mínimo de 100 “slit diaphragm” por amostra de tecido renal avaliada em elétronicografias com imagens lineares.

Utilizando esta metodologia observamos que a espessura da MBG de animais diabéticos foi significativamente maior nos animais do grupo G2 em relação aos animais do grupo normal G1, o que está de acordo com estudos realizados por Hagg<sup>42</sup>, Mifsud et al<sup>47</sup> e Hansen et al<sup>86</sup>.

Nossas observações também comprovam estudos anteriores nos quais foi observado que as lesões crônicas determinadas pelo diabetes são nitidamente relacionadas com o tempo de exposição à doença, sendo mais graves nos animais com o estado metabólico descompensado<sup>35,56,87</sup>.

O espessamento da MBG é um sensível marcador do estado diabético. Acredita-se que seja conseqüente a vários distúrbios metabólicos, próprios do estado diabético, que se refletem em todas as membranas, mais do que um defeito hereditário; na realidade, ocorrem alterações nas membranas da pele, músculos, retina, além da glomerular. Supunha-se que havia uma predisposição genética para o espessamento da MBG nas diversas áreas do organismo, tais como: músculos, pele, retina, rins e que

fosse independente da hiperglicemia<sup>88</sup>. Steffes et al<sup>89</sup> demonstraram serem necessárias as anormalidades metabólicas do diabetes para o aparecimento desta alteração, quando verificaram em gêmeos idênticos, com e sem diabetes insulino dependente, que as membranas de gêmeos não diabéticos tinham espessura normal, enquanto nos diabéticos, as membranas eram espessadas. Eles demonstraram, ainda, que não houve correlação entre o grau de espessamento da membrana basal em músculo e membrana basal glomerular nos diabéticos.

Ratos com *Diabetes Mellitus* induzidos pela administração endovenosa de aloxana desenvolvem lesões renais que muito se assemelham às lesões encontradas no diabetes humano<sup>36,39,40,90</sup>.

Essas lesões, caracterizadas pelo comprometimento de glomérulos e túbulos renais, iniciam-se precocemente na vida do animal, assumem caráter progressivo e agravam-se significativamente após o 6º mês do início do diabetes, em relação aos seus controles<sup>39,40</sup>.

Todavia, lesões glomerulares não são exclusividades de ratos diabéticos. Em estudos conduzidos em nosso laboratório<sup>36,40</sup>, observou-se que ratos normais, não diabéticos, apresentaram lesões renais progressivas com a idade, que não diferiram histologicamente das lesões observadas em animais diabéticos sacrificados com um e três meses de seguimento. Essas observações ratificam a importância de estudos experimentais utilizando amostras pareadas, com animais de idade e tempo de seguimento equivalentes.

Brownlee e Spiro<sup>91</sup>, através de técnicas utilizando aminoácidos marcados com radioisótopos, verificaram em ratos

diabéticos aloxânicos uma acelerada síntese de membrana basal glomerular.

Na nefropatia diabética a produção de matriz extracelular, da qual se compõe o tecido mesangial e a síntese da membrana basal glomerular, supera a degradação, ocorrendo acúmulo de matriz protéica nos compartimentos glomerulares e túbulo-intersticiais<sup>92</sup>.

No estudo de Lerco<sup>40</sup>, à microscopia óptica, observou-se um espessamento da MBG, associado ao alargamento mesangial e espessamento da cápsula de Bowman em todos os animais estudados, tanto normais como diabéticos. Todavia, essas lesões foram significativamente mais graves em animais diabéticos, a partir do 6º mês de seguimento.

O mais importante constituinte em termos quantitativos da MBG é o colágeno tipo IV. Outras macromoléculas incluem proteoglicanos e glicoproteínas: laminina, fibronectina, nidogênio, entactina. A prevenção do espessamento da MBG experimental foi obtida com a normalização do diabetes pelo transplante de ilhotas de Langerhans e pelo transplante de pâncreas<sup>36,93,94</sup>, e em experimento com o emprego de drogas por 12 meses de forma isolada ou associada (acarbose e insulina); com diminuição do espessamento da MBG, resultado esse já observado à microscopia eletrônica por Macedo et al<sup>35</sup>.

A reversibilidade do espessamento da MBG na nefropatia diabética é bastante lenta. Steffes et al<sup>95</sup>, realizando transplante de ilhotas de Langerhans, em ratos, depois de 7 meses de diabetes, observaram que após 6 meses de normalização da glicemia não se observou tendência à normalização da MBG.

Em 1985, Macedo et al<sup>32</sup>, em estudo semiquantitativo à microscopia óptica, observaram reversão do espessamento da MBG

após transplante de pâncreas, em ratos com diabetes de longa duração.

Fioretto et al<sup>24</sup>, em 1998, estudaram oito pacientes cinco e dez anos depois de receberem transplante de pâncreas, medindo a MBG dos rins nativos desses pacientes, através do microscópio eletrônico. Esses autores constataram a diminuição do seu espessamento aos cinco anos e uma normalização do mesmo após dez anos; significando que o prolongado período de normoglicemia reverteu o processo, não se conhecendo o real motivo para esses resultados. É possível que, além do aumento da síntese de MBG, a glicosilação do colágeno que a constitui, contribua para lentificar a sua degradação<sup>96,97</sup>, e que a substituição de matriz glicosilada por matriz não glicosilada, após normalização glicêmica, necessita de tempo longo para ocorrer. Em 1980 Cohen et al<sup>98</sup> estudando membrana basal glomerular de ratos diabéticos determinaram a extensão da glicosilação do colágeno da MBG que foi significativamente mais elevada nos ratos diabéticos do que nos normais, enquanto que também foi observado que essa glicosilação torna a MBG mais resistente à degradação proteolítica<sup>99</sup>. Reckelhoff et al<sup>100</sup> demonstraram que enzimas que degradam colágeno de membrana basal glomerular ou metaloproteinases estavam com atividade diminuída em 50% nos ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina.

É provável que a síntese aumentada e a degradação diminuída da MBG não sejam fenômenos mutuamente exclusivos e que operem simultaneamente em taxas diferentes, sendo que a síntese aumentada é predominante no início da doença, enquanto que a degradação diminuída ocorre mais tardiamente no curso do diabetes.

O perfeito controle das desordens metabólicas no diabetes é de fundamental importância na prevenção, estabilização ou mesmo reversão das lesões crônicas da doença, incluindo o espessamento da membrana basal glomerular.

O número de podócitos dos ratos diabéticos foi significativamente menor que o observado nos ratos normais, resultado também obtido por Mifsud et al<sup>47</sup>.

A cápsula de Bowman possui dois folhetos, um externo ou parietal e um interno ou visceral; este é acoplado aos capilares glomerulares e é revestido pelas células denominadas de podócitos, que são formadas por corpo celular, do qual partem diversos prolongamentos que são os processos podálicos. Os prolongamentos interdigitam-se deixando entre si espaços denominados "slit diaphragm"<sup>101</sup>. Kriz et al<sup>102</sup> chamaram a atenção para quatro mecanismos, segundo os quais ocorre a progressiva lesão glomerular que resulta na glomeruloesclerose, e apontaram para a importância da perda dos podócitos. Do ponto de vista estrutural, eles consideram o glomérulo como uma estrutura complexa, cuja estabilidade depende das funções cooperativas entre a MBG, as células mesangiais e os podócitos, que contrabalançam as forças de distensão do próprio glomérulo. Para esses autores, a insuficiência desse sistema gera lesões na sua estrutura. Consideram que há uma forte evidência de que os podócitos são incapazes de se regenerar no período pós-natal, e que a perda dos podócitos pode causar áreas "nuas" de MBG, que formam pontos potenciais para as lesões glomerulares irreversíveis, uma vez que nas áreas "nuas" de MBG ocorre aderência entre a MBG e as células epiteliais parietais formando sinéquias. As sinéquias são o início da glomeruloesclerose.

Mundel<sup>103</sup>, em editorial no “Kidney International”, de 2003, afirma que o podócito glomerular forma a barreira final à perda de proteína urinária, o que explica porque a agressão do podócito está intimamente associada com proteinúria evidente. Os eventos iniciais, segundo estes autores, são caracterizados por alterações moleculares do “slit diaphragm” dos podócitos, sem alterações morfológicas visíveis, ou por uma reorganização das estruturas dos processos podócitos com a fusão dos “slit diaphragm”, evidentes à microscopia eletrônica. Os podócitos sofrem os seguintes eventos antes do desprendimento: vacuolização e formação de pseudocistos. Os resultados desses eventos levam a formação das sinéquias, entre a MBG e as células parietais<sup>102</sup>; lesões estas consideradas irreversíveis, evoluindo para glomeruloesclerose e insuficiência renal terminal.

Petermann et al<sup>104</sup> afirmam que está bem estabelecido que a diminuição do número de podócitos, contribui para a instalação da glomeruloesclerose e que na nefropatia diabética o número de podócitos está diminuído. Consideram três razões para este fato: 1) os podócitos são incapazes de se regenerar e substituir as células perdidas, 2) ocorre a apoptose dos podócitos e 3) os podócitos se desprendem das células da MBG.

Por outro lado, vários estudos têm documentado a presença de podócitos urinários em várias doenças glomerulares em animais e humanos, incluindo a nefropatia diabética<sup>105</sup>.

Vogelmann et al<sup>106</sup>, referiram a presença de podócitos humanos viáveis na urina em indivíduos saudáveis e em nefropatas e concluíram que na doença avançada, os podócitos viáveis se destacam do tufo glomerular devido a fatores locais e não a defeitos dos podócitos de “per si”, enquanto que nos indivíduos saudáveis são os podócitos senis que se desprendem e são eliminados pela

urina. Admite-se que os podócitos não proliferam, porém, tem sido observado em cultura de células (in vitro) que estas estruturas tiveram proliferação por 5 dias, porém com apoptose a seguir<sup>104</sup>.

Steffes et al<sup>107</sup> estudando biópsias renais de pacientes diabéticos tipo I, com diferentes idades e tempo de doença, e as comparando com biópsias renais normais, documentaram a estabilização do número de podócitos entre a 2<sup>a</sup> e a 7<sup>a</sup> décadas da vida, em indivíduos não diabéticos, além da diminuição significativa do número de podócitos nos diabéticos de curta ou longa duração, afirmando pelos seus resultados que no diabetes tipo I, em média, é perdido um em cada cinco podócitos glomerulares, nos primeiros cinco anos de doença.

Estudo de Vestra et al<sup>50</sup>, analisando 67 pacientes diabéticos tipo II: 21 normoalbuminúricos, 23 microalbuminúricos e 23 proteinúricos, por análise morfométrica e microscopia eletrônica de biópsias renais, encontraram um número menor de podócitos por glomérulo no grupo diabético, em relação ao grupo normal, sendo observado um valor menor, nos microalbuminúricos e proteinúricos, em relação aos normoalbuminúricos.

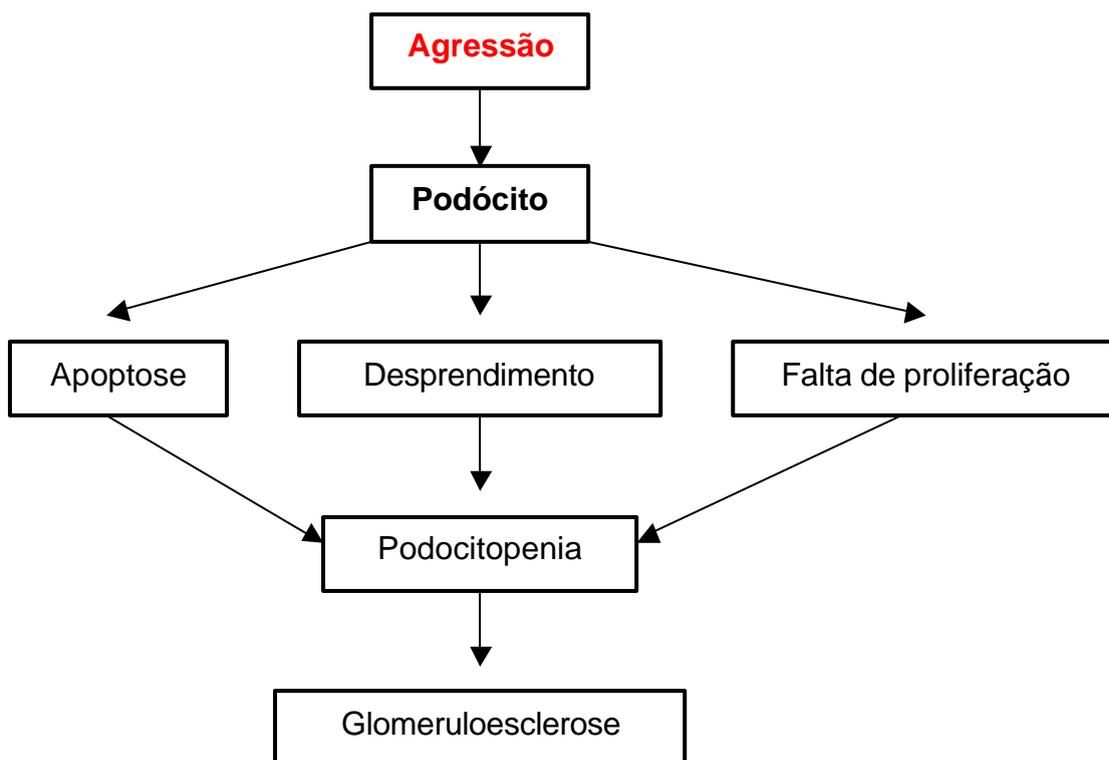
A excreção urinária de proteína que caracteriza a nefropatia diabética aponta, então, para o papel do podócito para explicar a sua patogênese. Meyer et al<sup>46</sup> estudaram 16 índios Pima diabéticos, por 13 anos, observando uma elevação da albuminúria de 67 mg/dl para 625 mg/dl, e observaram em biópsias renais que dentre as características morfológicas glomerulares, o número de podócitos foi o fator mais relevante no prognóstico da progressão da doença renal; os pacientes com menor número de células apresentavam uma progressão rápida da glomerulosclerose.

Mifsud et al<sup>47</sup> observaram experimentalmente uma diminuição do número de “slit diaphragm” que é indicativo de

fusão dos processos podais dos podócitos e também, um menor número de podócitos em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina.

O número estatisticamente menor de podócitos por nós observado em ratos diabéticos proteinúricos, a longo prazo, está de acordo com os relatos da literatura, e reproduz o que tem sido observado, tanto na nefropatia diabética humana<sup>48,50,108</sup> como experimental<sup>47</sup>.

O esquema abaixo (Fig. 19) resume os principais mecanismos considerados para a podocitopenia e glomeruloesclerose.

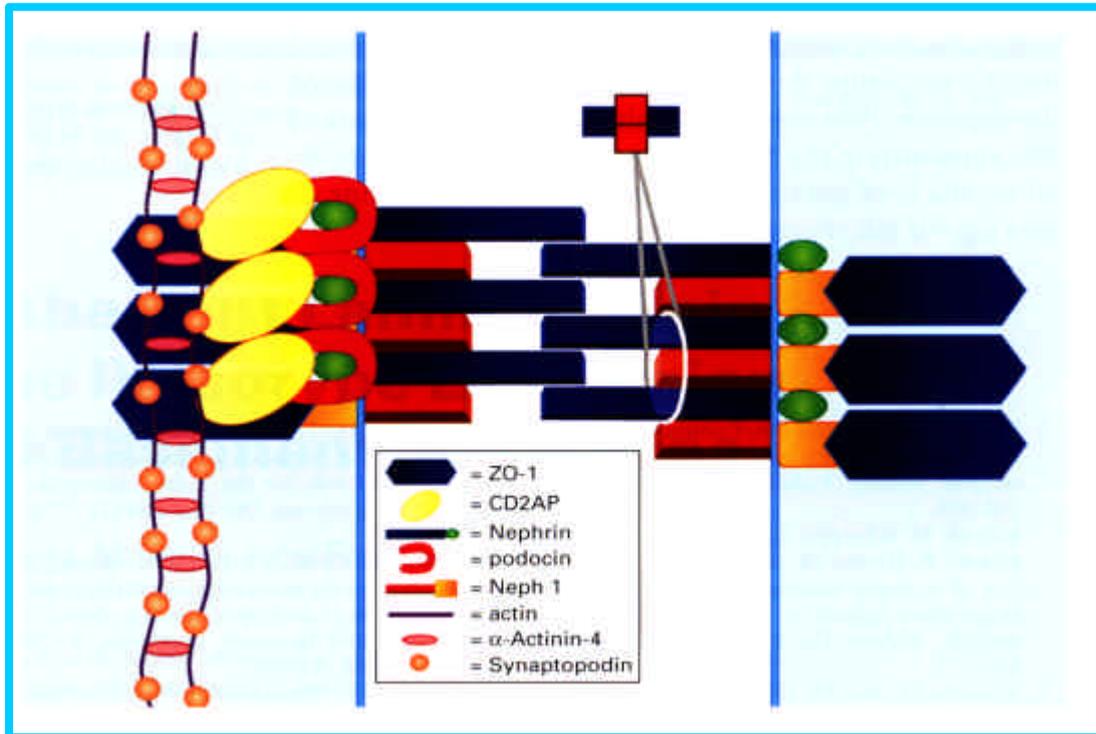


**Figura 19.** Após agressão, os podócitos podem sofrer apoptose ou desprendimento da MBG ou falta de proliferação. Esses eventos causam podocitopenia que contribui para a glomeruloesclerose progressiva. Adaptado de Mundel & Shankland<sup>48</sup>.

Além da ultraestrutura, a composição do “slit diaphragm” tem sido muito estudada. Em 1974, Rodewald & Karnovsky<sup>109</sup> descreveram o “slit diaphragm” pela microscopia eletrônica de transmissão como sendo uma estrutura protéica tridimensional formando pontos com padrão semelhante a um zíper.

Nos últimos dois anos, têm se intensificado os estudos sobre a estrutura e formação do “slit diaphragm”, mostrando que este é constituído por uma malha de nefrina. Outras proteínas são encontradas na barreira de filtração glomerular: podocina, CD2AP, ZO-1, actina e alfa actina 4, sendo estas últimas, proteínas podocitárias, intimamente ligadas à nefrina e interagindo com ela<sup>110</sup>.

A figura 20 representa um modelo molecular do “slit diaphragm” e as moléculas protéicas já descritas até o momento, e inclui a sinaptopodina e a Neph 1.



**Figura 20.** Modelo molecular do "slit diaphragm". As linhas verticais em azul representam os limites de dois processos podálicos adjacentes. A nefrina intracelular liga-se a podocina e a CD2AP. A Neph 1 liga-se a podocina e ZO-1. A CD2AP liga-se a actina, alfa actina 4 e sinaptopodina. Essas interações proporcionam estabilidade ao "slit diaphragm" e talvez aos processos podálicos. Adaptado de Miner JH<sup>49</sup>.

Langham<sup>111</sup> estudaram em pacientes diabéticos a expressão da nefrina, obtendo material renal diabético através de biopsias em 14 pacientes diabéticos e material renal (córtex) normal, em 6 pacientes submetidos à remoção do rim, devido a tumor maligno. Como resultado, obtiveram redução significativa da expressão da nefrina nos pacientes diabéticos e uma relação inversa entre esta e o grau de proteinúria.

Kelly et al<sup>112</sup> estudaram a expressão do gene da nefrina em ratos diabéticos proteinúricos pela estreptozotocina e obtiveram como resultado, uma expressão menor nos animais diabéticos com relação ao grupo controle. Isto pode ser explicado pelo número menor de podócitos, ou por ter havido uma redução primária da nefrina que desestabilizou a estrutura ocasionando a perda do podócito e também a proteinúria.

A extensão dos “slit diaphragm”, no trabalho por nós realizado, foi significativamente menor nos ratos diabéticos, quando comparada a observada nos ratos normais. Resultado semelhante foi observado por Bjorn et al<sup>113</sup>. Estes autores estudaram 28 pacientes diabéticos proteinúricos, microalbuminúricos e normoalbuminúricos e 11 rins de doadores não diabéticos. Encontraram uma diminuição significativa na extensão dos “slits” no grupo diabético com proteinúria quando comparado com o grupo normoalbuminúrico. Estes autores que em comunicação pessoal, Rash R., cita um estudo com ratos diabéticos proteinúricos, induzidos pela estreptozotocina, no qual observou-se diminuição da extensão do “slit diaphragm”, como observado em nossos resultados. Bjorn et al<sup>113</sup> enfatizam que uma maior extensão do “slit diaphragm” não é o fator responsável pela perda urinária de albumina em pacientes diabéticos; e que a explicação para tal evento está baseada nos constituintes celulares. A membrana celular dos

podócitos e os diafragmas são revestidos por espessa camada, rica em sialoglicoproteínas (ex. podocalixina, podoendina), responsáveis pela carga negativa destas células. Mais ainda, os prolongamentos contêm microtúbulos, microfilamentos e alguns ribossomos livres<sup>80,101</sup>. A redução da extensão do “slit diaphragm” poderia, segundo Bjorn et al<sup>113</sup>, derivar de uma perda progressiva dessas cargas favorecendo o trânsito de um poliânion (albumina) através da barreira glomerular<sup>113</sup>.

Nesse trabalho é provável ter havido uma diminuição primária da quantidade de nefrina dos “slit diaphragm”, bem como uma diminuição das cargas negativas desses “slit diaphragm”, resultando em proteinúria.

Podemos afirmar que o estado diabético determinou alterações estruturais significativas na barreira de filtração glomerular constituída pela MBG, pelos podócitos e pelos “slit diaphragm”, o que resultou em proteinúria, e que estas alterações estruturais determinarão a glomeruloesclerose progressiva, característica da nefropatia diabética experimental.

---

## Conclusões

Baseados nos resultados obtidos e nas condições experimentais do presente trabalho, concluimos que:

1. A aloxana a 2%, na dose de 42 mg/kg de peso corporal, induziu um quadro de diabetes experimental grave no rato, diagnosticado por hiperglicemia, glicosúria, alterações clínicas evidentes quanto ao peso, ingestão hídrica e diurese, bem como o desenvolvimento de proteinúria;
2. Os glomérulos renais de animais diabéticos proteinúricos demonstraram ter maior espessura da MBG, menor número de podócitos, menor número de “slit diaphragm” e menor extensão dos “slit diaphragm”; lesões estas compatíveis com a nefropatia diabética;
3. O estudo morfométrico do rim mostrou-se de grande valia para a caracterização ultra-estrutural da microangiopatia e nefropatia diabética.

---

**Resumo**

Sessenta animais da espécie "*Rattus wistar*" de ambos os sexos, pesando de 200 a 300 gramas, foram divididos em dois grupos experimentais: G1 ou grupo normal, constituído por dez animais e G2 ou grupo diabético, constituído inicialmente por 50 animais, que foram inoculados com aloxana à 2% por via endovenosa, na dose de 42mg/kg de peso corporal. Desses, dez animais com diabetes experimental grave (glicemia maior que 200mg/dl), sobreviveram durante o seguimento de 12 meses e constituíram o grupo diabético ou G2. Os seguintes parâmetros clínicos e laboratoriais foram estudados em cada grupo experimental: aspecto geral dos animais, peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese e dosagens da glicemia, glicose urinária e proteinúria. As observações, com exceção da proteinúria de 24 horas, foram observadas em três momentos experimentais: inicial ou 14 dias após a indução do diabetes no grupo diabético e 14 dias de observação no grupo normal, 6º e 12º mês de seguimento. A dosagem da proteinúria de 24 horas foi efetuada no 12º mês de seguimento nos dois grupos experimentais.

Após o 12º mês de seguimento, os animais foram sacrificados, após anestesia, e o rim direito de quatro animais diabéticos e quatro animais normais, escolhidos ao acaso, foi preparado para o estudo à microscopia eletrônica. As elétrono-micrografias obtidas com aumento de 42.000 vezes foram analisadas por morfometria pela utilização de sistema computadorizado "Quin Lite 2,5 LEICA", interessando a espessura da MBG, o número de podócitos, o número de "slit diaphragm" e a extensão dos "slit diaphragm". Os resultados dos parâmetros clínicos e bioquímicos foram analisados pelo teste de comparações múltiplas de Tukey e pela análise não paramétrica de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis,

adotando-se o nível de significância de  $p < 0,05$ . Os resultados dos estudos morfométricos foram avaliados por análise não paramétrica pelo teste de Mann-Whitney, usando o programa para computadores "Sigma Stat 2,0", adotando-se o nível de significância de 5%. Os animais do grupo G2 apresentaram peso corporal inferior, e ingestão hídrica e diurese mais elevadas que os animais do grupo G1; o aspecto geral dos animais do grupo G2 esteve comprometido, o que não ocorreu no grupo G1.

A glicemia e a glicosúria do grupo G2 sempre foram superiores às do grupo G1. A proteinúria do grupo G2 foi superior a do grupo G1.

Quanto à análise morfométrica, a espessura da MBG dos animais do grupo G2, foi significativamente maior do que a observada nos animais do grupo G1. O número de podócitos e de "slit diaphragm" foi significativamente menor nos animais do grupo G2 em relação ao grupo G1, e a extensão dos "slit diaphragm" significativamente menor no grupo G2 em relação ao grupo G1.

Concluiu-se que a aloxana a 2% produziu quadro grave de diabetes experimental com proteinúria significativa, e que o estudo morfométrico mostrou-se de grande valia para a caracterização da nefropatia diabética experimental em ratos proteinúricos. Esta caracterizou-se morfometricamente pelo maior espessamento da MBG, menor número de podócitos e de "slit diaphragm" glomerulares e menor extensão dos "slit diaphragm".



# **Abstract**

Sixty "*Rattus wistar*" of both sexes with 200-300 g of body weight, were divided in two experimental groups: normal group (G1 - 10 animals) and diabetic group (G2- 50 animals at the beginning), which were inoculated with a endovenous injection of 2% alloxan in a dose of 42 mg /kg/body weight. From these ten animals with severe experimental diabetics (glicemia > 200 mg%) will survive during 12 months of follow-up, being considered the experimental group (G2).

The following clinic and laboratory parameters were studied: clinical aspect, body weight, water and food intake, diuresis, as well fasting glycemia, urinary glucose and proteinuria. The observations, excepting proteinuria (24 hours) were made at three experimental moments as it follows: initial or 14 days after diabetes induction or follow-up (normal controls) and at 6 and 12 months. Proteinuria was measured at the 12<sup>th</sup> month in boths groups.

After 12 months of diabetes induction or follow-up (G1), the animals were sacrificed being the right kidney from four animals of each group processed for Electron Mycroscopy. The electron micrographys were taken with magnification of 42,000 and were analysed according to morphometric techniques by using computer System "Quin Lite 2.5 LEICA", being studied the following aspects: glomerular basement membrane thickening, podocytes and slit diaphragm number, and the slit diaphragm extension.

The results of the clinical and laboratory parameters were statistically analysed according to Tukey's multiple comparison being used the level of 5% significance. The results of morphometric study were analysed according to Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test, using a software "Sigma Stat 2,0", being used level of 5% significance. G2 group presented lower body

weight, higher water intake and diuresis than G1 group; the general aspect of G2 group was compromised.

The glycemic levels and the urinary glucose levels of G2 group were always higher than G1 group. The proteinuria of G2 group were higher than G1 group.

In regard to the morphometric analysis, the glomerular basement membrane thickness of G2 group was significantly increased than the observed in animals of G1 group. The podocyte and the slit diaphragm number of G2 group was significantly decreased than the observed in animals of G1 group, and the slit diaphragm extension was significantly decreased in G2 group comparing with G1 group.

We concluded that the 2% alloxan induced a severe experimental diabetes including a significative proteinuria, and that the morphometric study was of great value for the diabetes nephropathy characterization in proteinuric rats. The main morphometric characterist were: increasing of the GBM thickness, decreased number of podocytes and of the slit diaphragm and decreased slit diaphragm extension.

---

## **Referências Bibliográficas**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

1. Sociedade Brasileira de Endocrinologia. Diabetes: definição. [Online], 2004.[acesso 2004 jan.15]. Disponível em: <http://www.endócrino.org.br>
2. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diabetes: Consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes - CSBD, 2002 [Online],2004.[acesso 2004 jan.15]. Disponível em: [http://www.diabetes.org.br/diabetes/info\\_medicos/consenso/cons\\_set.html](http://www.diabetes.org.br/diabetes/info_medicos/consenso/cons_set.html).
3. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diabetes: Estatísticas da diabetes no Brasil.[Online],2004.[acesso 2004 jan.15]. Disponível em: [http://www.diabetes.org.br/diabetes/diabet\\_set.html](http://www.diabetes.org.br/diabetes/diabet_set.html).
4. Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter Study of the prevalence of Diabetes Mellitus and Impaired glucose tolerance in the urban brazilian population aged 30-69 yr. *Diabetes Care* 1992;15:1509-16.
5. La Porte RE. Cruickshanks: incidence and risk factors for insulin-dependent diabetes. In: Harris MI, Hamman RF, editors. *Diabetes in America*. Bethesda: National Diabetes Data Group, NIADDK/US, Dept Health and Human Services; 1985. p. 1-12. (NIH publ. nº 85 - 1468).

---

\*Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para originais submetidos a revistas biomédicas. *J Pediatr* 1997;73:213-24.

National Library of Medicine List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2001. 248p.

6. Królewski AS, Warram JH, Rand LI, Kann CR. Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications. *N Engl J Med* 1987; 317: 1390-8.
7. Kuller WH. Epidemiology of cardiovascular diseases: current prospectives. *Am J Cardiol* 1976; 38: 46.
8. Ritz E, Nowack R, Fliser D, Koch M, Tschope W. Type II diabetes is the renal risk adequately appreciated? *Nephrol Dial Transplant* , 1991; 6: 679-82.
9. Hostetter TH. Diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1985; 312: 642-4.
10. U S Renal Data System. U S Renal Data System annual report. Bethesda: National Institutes of Health and National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2000.
11. Schor N, Srougi M. *Nefrologia urologia clínica*. São Paulo: Sarvier; 1998. p78-81.
12. Lukens FDW. Alloxan diabetes. *Physiol Rev* 1948;28: 304-30.
13. Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol* 1967; 126: 201-5.
14. Mordes JP, Rossini AA. Animal model of diabetes mellitus. In: Marble A, Krall LP, Bradley RF, Christlieb AR, Soeldner JS, editors. *Joslin's diabetes mellitus*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1985. p.110-37.
15. Lee CS, Mauer SM, Brown DM, Sutherland DE, Michael AF, Najarian JS. Renal transplantation in diabetes mellitus in rats. *J Exp Med* 1974; 139: 793-800.

16. Rasch R. Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment: glomerular basement membrane thickness. *Diabetologia* 1979; 16: 319-24.
17. Mauer SM, Sutherland DER, Steffes MW, Leonard RJ, Najarian JS, Michael AF. Pancreatic islet transplantation. Effects on the glomerular lesions of experimental diabetes in the rat. *Diabetes* 1974; 23: 748-53.
18. Mauer SM, Steffes MW, Connett J, Sutherland DER, Barbosa J. The development of lesions in the glomerular basement membrane and mesangium after transplantation of normal kidney to diabetic patients. *Diabetes* 1983; 32: 948-52.
19. Brown DM, Andres GA, Hostetter TH, Mauer SM, Price R, Venkatachalam MA. Kidney complication. *Diabetes* 1982; 31: 71-81.
20. Diabetes Complications and Control Trial (DCCT) Research Group. The effect of diabetes on the development and progression of long-term complications of insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86.
21. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33): UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998; 352: 837-53.
22. Mogensen CE, Christensen CK, Christensen PD. The abnormal albuminuria syndrome in diabetes. In: Belfiore F, Bergman

- RN, Molinatti GM, editors. Current topics in diabetes. Basel: Karger; 1993: v12,p 135-46.
23. Barbosa J, Steffes MW, Sutherland DER, Comnett JE, Rao KV, Mauer SM. The effect of glycemic control on early diabetic renal lesions. JAMA 1994; 272: 600-6.
  24. Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DER, Goetz FC, Mauer SM. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. N Engl J Med 1998; 339: 69-75.
  25. International Pancreas Transplant Registry (IPTR). Transplant pancreas: University of Minnesota (USA), 2003 [Online], 2004. [acesso 2004 Jan.15]. Disponível em: [http://www.iptr.umn.edu/ar\\_midyear\\_update\\_index.htm](http://www.iptr.umn.edu/ar_midyear_update_index.htm).
  26. Gruessner AC, Sutherland DER. Analyses of pancreas transplant outcomes for United States cases reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and non-US cases reported to the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). Clin Transpl 1999; 51-69.
  27. Genzini T, Lasi M, Marchini GS, Chang AAI, Abensur H, Noronha IL, Miranda MP. Influência do transplante de pâncreas isolado na função do rim nativo. editores. Trabalho apresentado no IV Congresso Brasileiro de Transplante de Fígado, Pâncreas e Intestino Delgado e III Encontro de Transplante de Pâncreas e Pâncreas-Rim; 2004 maio 20-2; Belo Horizonte-MG: Brasil; 2004. p. 16-7.

28. Nicoluzzi JE, Marmanillo CW, Repka JCD. Transplante simultâneo pâncreas-rim em portador de diabetes mellitus tipo 1 com insuficiência renal crônica. Experiência inicial do Hospital Angelina Caron. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003; 47(3): 243-7.
29. Tyden G, Bolinder J, Solders G, Nakache R, Brattstrom C, Tibell A, et al. A 10 year prospective study of IDDM patients subjected to combined pancreas and kidney transplantation or kidney transplantation alone. *Transplant Proc* 1998; 30: 332.
30. Sudan D, Sudan R, Strata R. Long-term outcome of simultaneous kidney-pancreas transplantation analysis of 61 patients with more than 5 years follow-up. *Transplantation* 2000; 69: 330.
31. Macedo AR, Skivolocki WP, Thompson KR, Bell Jr RH, Lee S, Orloff MJ. Morphometric electron microscopic study of the effect of whole pancreas transplantation on alloxan diabetic neuropathy. *Surg Fórum* 1981; 32: 379-80.
32. Macedo CS, Greenleaf GE, Sayers HJ, Orloff MJ. Effect of whole pancreas transplantation on long-established kidney lesions of diabetes. *Surg Fórum* 1985; 36: 346-8.
33. Macedo AR, Macedo CS, Mercadante MCS, Spadella CT, Breim LC, Machado JLM, et al. Pancreaticoduodenal graft versus islets of Langerhans transplantation on control of diabetic state in rats. *Dig Dis Sci* 1986; 31: 3129.

34. Machado JLM. Neuropatia diabética experimental: estudo morfológico e morfométrico do nervo ciático de ratos diabéticos. [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1993.
35. Macedo CS, Silva MD, Spadella CT, Breim LC, Capelletti SM, Mercadante MCS, et al. Effect of long-term treatment with insulin and/or acarbose on glomerular basement membrane thickening in alloxan-diabetic rats. *Braz. J Med Biol Res* 1996; 29: 1329-35.
36. Spadella CT, Schellini AS, Bacchi CE. Pancreas transplantation versus islet transplantation versus insulin therapy in the prevention of nephropathy in alloxan-induced diabetic rats. *Transplant Proc* 1998; 30: 327-9.
37. Spadella CT, Mercadante MCS, Schellini SA, Machado JLM, Oliveira WK, Bacchi CE. Effect of pancreas transplantation on the prevention of nephropathy in alloxan-induced diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 1019-24.
38. Schellini SA. Retinopatia diabética experimental: estudo estrutural, ultra-estrutural e morfométrico da retina de ratos normais, diabéticos e diabéticos tratados. [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina - Universidade Estadual Paulista; 1992.
39. Macedo CS. Nefropatia diabética experimental no rato. Efeito de acarbose, insulina e acarbose associada a insulina sobre as lesões renais. Estudo semiquantitativo à microscopia óptica.

- [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2000.
40. Lerco MM. Caracterização do modelo experimental de *Diabetes Mellitus* induzido pela aloxana. Estudo clínico, laboratorial e histopatológico do rim, retina, coronária, aorta e artéria ilíaca do rato. [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Paulista; 2000.
  41. Fox CJ, Darby SC, Ireland JT, Sonksem PH. Blood glucose control and glomerular capillary basement membrane in experimental diabetes. *Br Med J* 1977; 2: 605-7.
  42. Hagg E. Renal lesions in rats with long-term alloxan diabetes. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1974; 82: 199-210.
  43. Rasch R. Studies on the prevention of glomerulopathy in diabetic rats. *Acta Endocrinol Suppl* 1981; 242: 43-4.
  44. Steen Olsen T, Orskov H, Lundbaek K. Kidney lesions in rats with severe long-term alloxan diabetes. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1966; 66: 1-12.
  45. Weil R, Nozawa M, Koss M, Weber C, Reemtsma K, McIntosh R. The kidney in streptozotocin diabetic rats. Morphologic, ultrastructural and function studies. *Arch Pathol Lab Med* 1976; 100: 37-49.
  46. Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG. Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with type II diabetes and microalbuminuria. *Diabetologia* 1999; 42: 1341-4.

47. Mifsud SA, Allen TJ, Bertam JF, Hulthen UI, Kelly DJ, Cooper ME, et al. Podocyte foot process boadening in experimental diabetic nephropathy: amelioration with renin-angiotensin blockade. *Diabetologia* 2001; 44: 878-82.
48. Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and Response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002;13: 3005-15.
49. Miner JH, A molecular look at the glomerular barrier. *Nephron Exp Nephrol* 2003; 94: 119-22.
50. Vestra MD, Masiero A, Roiter AM, Saller A, Crespaldi G, Fioretto P. Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy?: Studies in patients with type 2 diabetes [complications]. *Diabetes* 2003; 52(4): 1031-5.
51. Tryggvason K. Nephrin: role in normal kidney and disease. In: *Advances in Nephrology* St Louis: Mosby Inc; 2001. p.221-34.
52. White KE, Bilous RW, Marshall SM, Remuzzi G, Piras G, De Cosmo S, et al. Podocyte number in normotensive type I diabetic patients with albuminuria. *Diabetes* 2002; 51: 3083-9.
53. Montgomery DC. Design and analyses of experiments. 3<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley; 1991.
54. Fisher LD, Belle GV. Biostatistics H methodology for the Health Sciences. New York: Wiley-Interscience; 1993.
55. Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol* 1967; 126: 201-5.

56. Orloff MJ, Lee S, Charters AC, Grambort DE, Storck G, Knox D. Long-term studies of pancreas transplantation in experimental diabetes mellitus. *Ann Surg* 1975; 182: 198-206.
57. Orloff MJ, Macedo AR, Macedo CS, Yamanaka N, Huang YT, Huang DG, et al. Prevention, stabilization and reversal of the metabolic disorders and secondary complications of diabetes by pancreas transplantation. *Transplant Proc* 1988; 20: 868-73.
58. Breim LC. Estudo comparativo entre o transplante total de pâncreas, transplante de ilhotas de Langerhans, e o tratamento convencional com insulina no controle das manifestações clínicas do diabetes aloxânico no rato.[dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1990.
59. Mering JV, Minkowski O. Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation. *Arch Exp Pathol Pharm* 1989; 26: 371-87.
60. Hetherington AW, Ranson SW. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec* 1940; 78: 149-53.
61. Cavellero C, Mosca L. Mitotic activity in the pancreatic islets of the rat under pituitary growth hormone and adrenocorticotropic hormone treatment. *J Pathol Bacteriol* 1953; 66: 147-51.
62. Lazarus SS, Bencosme SA. Alterations of pancreas during cortisone diabetes in rabbits. *Proc Soc Exp Biol* 1955; 89: 114-9.
63. Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. Virus-induced diabetes mellitus: isolation of a virus from the pancreas of a

- child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* 1979; 300: 1173-7.
64. Dunn JS, Sheehan HL, McLetchie NGB. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet* 1943; 1: 484-7.
65. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies in the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother Rep* 1963; 29: 91-4.
66. Bray GA, Gallacher Jr TF. Manifestations of hypothalamic obesity in man: a comprehensive investigation of eight patients and a review of the literature. *Medicine* 1975; 54: 301-7.
67. Hales CN, Kennedy GC. Plasmagluucose, nonesterified fatty acid and insulin concentrations in hypothalamic-hyperphagic rats. *Biochem J* 1964; 90: 620-6.
68. Hausberger FX, Ramsay AJ. Islet hypertrophy in obesity of mice bearing ACTH-secreting tumors. *Endocrinology* 1959; 65: 165-9.
69. Franckson JRM, Gepts W, Bastenie PA. Observations sur le diabete steroid du rat. *Acta Endocrinol* 1953; 14: 153-6.
70. Abelove WA, Paschiks KE. Comparison of the diabetogenic action of cortisone and growth hormone in different species. *Endocrinology* 1954; 55: 637-40.
71. Kern H, Logothetopoulos J. Steroid diabetes in the guinea pig: studies on islet cell ultrastructure and regeneration. *Diabetes* 1970; 19: 145-51.

72. Like AA, Chick WL. Pancreatic beta cell replication induced by glucocorticoids in subhuman primates. *Am J Pathol* 1974; 75: 329-32.
73. Junod A, Lambert AE, Stauffachr W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1968; 48: 2129-39.
74. Rossini AA, Like AA, Chik WL. Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74: 2485-91.
75. Lerco MM, Spadella CT, Machado JLM, Schellini SA, Padovani CR. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. *Acta Cir Bras* 2003; 18(2): 132-42.
76. Calderon IMP. Modelo experimental em ratas para estudo do binômio diabete e gravidez. [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1988.
77. Lazarow A, Palay SL. Production and course of alloxan diabetes in rats. *J Lab Clin Med* 1946; 31: 1004-15.
78. Brekke IB, Hostmark AT, Flaten O, Oyasoeter S. Effect of pancreas transplantation on plasma lipids and plasma concentrations of pancreatic hormones in streptozotocin diabetic rats. *Eur Surg Res* 1981; 13: 361-70.
79. Bondy PK. Distúrbios do metabolismo dos hidratos de carbono. In: Beeson PB, McDermott W, editors. *Tratado de medicina*. 13<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1973. v.2, p.1627-43.

80. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders Company; 1999.
81. Lee S, Chandler JG, Krubel R, Nakaji NT, Rosen H, Orloff MJ. Relief of diabetes mellitus by heterotopic transplantation on the whole pancreas inbred rats. *Surg Forum* 1971; 22: 75-7.
82. Lee S, Tung KSK, Koopmans H, Chandler JG, Orloff MJ. Pancreaticoduodenal transplantation in the rat. *Transplantation* 1972; 13: 421-5.
83. Ueda T, Lee S, Storck G. Metabolic effect of alloxan diabetic rats before and after pancreas transplantation. *Proc. Anat. Microsurg Soc* 1979; 3: 423-4.
84. Brekke IB, Gullesen I, Refsum SB, Flatmark A. Long-term endocrine function of duct-ligated pancreas isotransplants in rats. *Eur Surg Res* 1980; 12: 167-78.
85. Patrakka J, Lahdenk AT, Koskimies O, Holmberg C, Wartiovaara J, Jalanko H. The number of podocyte slit diaphragm is decreased in minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr Res* 2002; 52(3): 349-55.
86. Hansen RO, Lundbaek K, Olsen TS, Orskov H. Kidney lesions in rats with severe long-term alloxan diabetes glomerular ultrastructure. *Lab Invest* 1967; 17: 675-92.
87. Bell Jr RH, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J Surg Res* 1983; 35: 433-60.
88. Siperstein MD. Capillary basement membranes and diabetic microangiopathy. *Adv Intern Med* 1972; 18:325-44.

89. Steffes MW, Sutherland DER, Goetz FC. Studies of Kidney and muscle biopsy specimens from identical twins discordant for type I diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1985; 312: 1282-7.
90. Mauer SM, Steffes MW, Michael HF, Brown DM. Studies of nephropathy in animals and man. *Diabetes* 1976; 25: 850-7.
91. Brownlee M, Spiro RG. Glomerular basement membrane metabolism in the diabetic rat. In vivo studies. *Diabetes* 1979; 28: 121-5.
92. Fogo AB. Mesangial matrix modulation and glomerulosclerosis. *Exp Nephrol* 1999; 7: 147-59.
93. Bell Jr RH, Fernandez-Cruz L, Brimm JE, Sayers HA, Orloff, MJ. Prevention by whole pancreas transplantation of glomerular basement membrane thickening in alloxan diabetes. *Surgery* 1980; 88: 31-40.
94. Orloff MJ, Macedo CS, Macedo A. Comparison of Whole pancreas and pancreatic islet transplantation in controlling nephropathy and metabolic disorders of diabetes. *Ann Surg* 1987; 206: 324-34.
95. Steffes MW, Brown DM, Basgen SM. Glomerular basement membrane thickness following islet transplantation in the diabetic rat. *Lab Invest* 1979; 41: 116-8.
96. Brownlee M, Anthony C, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis diabetic complications. *N Engl J Med* 1988; 318: 1315-21.
97. Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Ann Rev Med* 1995; 46: 223-34.

98. Cohen MP, Surma M. Renal glomerular basement membrane. *J Biol Chem* 1980; 225: 1767-70.
99. Lubec G, Pollak A. Reduced susceptibility of non enzymatically glucosylated glomerular basement membrane to proteases. *Renal Physiol* 1980; 3: 4-8.
100. Reckelhoff JF, Tygart VL, Mitias MM, Walcott JL. STZ-induced diabetes results in decreased activity of glomerular cathepsin and metallo protease in rats. *Diabetes* 1993; 42: 1425-32.
101. Silva CR, Achkar R, Moura LA, Franco MF. Revisão: proliferação das células podocitárias - evidências pró e contra. *J Bras Nefrol* 2001; 23(1): 25-31.
102. Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular disease: is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 1998; 54:687-97.
103. Mundel P. Urinary podocytes: lost and found alive.[editorial]. *Kidney Int* 2003; 4: 1529-30.
104. Petermann AT, Krofft R, Blonski M. Podocytes that detach in experimental membranous nephropathy are viable. *Kidney Int* 2003; 64:1222-31.
105. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1379-83.
106. Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV. Urinary excretion of viable podocytes em health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285: 40-8.

107. Steffes MW, Schmidt D, McCreery R. Glomerular cell number in normal subjects and in type I diabetic patients. *Kidney Int* 2001; 59: 2104-113.
108. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest* 1997; 99: 342-8.
109. Rodewald R, Karnovski MJ. Porous substructure of the glomerular Slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 1974; 60: 423-33.
110. Tryggvason K. Nephrin: role in normal kidney and in disease *Adv Nephrol* 2001; 31: 221-34.
111. Langham RG. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *Diabetologia* 2002; 45: 1572-6.
112. Kelly DJ, Aaltonen P, Cox AJ. Expression of the slit-diaphragm protein, nephrin, in experimental diabetic nephropathy: differing effects of anti-proteinuric therapies. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1327-32.
113. Bjorn SF, Bangstad HJ, Hanssen KF, Nyberg G, Walker J, Viberti GC, et al. Glomerular epithelial foot process and filtration slits in IDDM patients. *Diabetologia* 1995; 38: 1197-204.



## **Apêndice**

**Tabela I** - Grupo Diabético - 12 MESES - Peso em gramas - Evolução no seguimento.

nº animal	IN	4º dia	14º dia	6m	12m
537	200	160	190	205	250
539	230	200	200	205	-
540	250	210	200	190	-
545	200	170	180	-	-
549	300	310	320	310	280
550	280	250	240	-	-
551	230	200	180	200	-
552	320	280	250	-	-
560	240	230	200	-	-
561	245	210	205	-	-
577	320	285	295	285	225
597	320	340	355	315	285
602	280	295	305	315	270
612	270	250	230	-	-
620	225	190	210	200	-
631	320	300	305	310	215
635	290	280	270	290	230
647	275	285	305	285	220
682	295	290	315	320	230
690	285	280	280	290	235

**Tabela II** - Grupo Normal - 12 MESES - Peso em gramas - Evolução no seguimento.

nº animal	IN	4º dia	14º dia	6 m	12m
815	290	300	320	480	520
816	330	340	345	465	530
817	335	340	380	460	500
818	305	315	325	400	430
819	325	330	340	395	440
820	300	310	330	475	520
821	280	290	290	340	510
822	290	295	300	410	500
823	330	330	330	450	540
825	290	295	305	420	525

**Tabela III** - Grupo Diabético - 12 MESES- Ingestão hídrica em ml/24h - Evolução no seguimento.

n° animal	IN	4° dia	14° dia	6m	12m
537	127	65	100	120	142
539	134	150	175	185	-
540	176	145	139	159	-
545	198	200	190	-	-
549	75	70	80	112	136
550	128	145	139	-	-
551	185	117	200	198	-
552	205	105	170	-	-
560	118	132	139	-	-
561	260	180	190	-	-
577	252	125	200	200	200
597	159	90	90	124	40
602	80	120	105	183	140
612	110	180	245	-	-
620	200	230	240	190	-
631	110	120	150	170	210
635	130	100	90	140	220
647	117	98	89	139	217
682	149	103	96	150	215
690	190	180	175	189	217

**Tabela IV** - Grupo Normal - 12 MESES - Ingestão hídrica em ml/24h - Evolução no seguimento.

n° animal	IN	4° dia	14° dia	6m	12m
815	65	50	25	50	48
816	50	45	40	40	55
817	50	45	37	39	54
818	62	50	29	60	50
819	58	55	25	40	48
820	67	60	50	49	45
821	50	47	40	50	54
822	47	50	39	38	49
823	59	60	55	56	45
825	61	55	45	45	53

**Tabela V** - Grupo Diabético - 12 MESES- Ingestão alimentar em g/12h- Evolução no seguimento.

n° animal	IN	4° dia	14° dia	6m	12m
537	30	15	15	15	30
539	35	15	20	40	-
540	40	10	15	15	-
545	30	15	20	-	-
549	40	10	30	25	30
550	35	15	20	-	-
551	30	20	30	30	-
552	30	15	10	-	-
560	40	10	20	-	-
561	30	25	20	-	-
577	40	50	40	35	55
597	30	15	20	30	15
602	35	25	40	35	25
612	35	15	20	-	-
620	30	25	15	15	-
631	35	20	20	15	20
635	30	20	25	25	25
647	35	15	15	35	20
682	30	10	15	30	15
690	35	20	25	35	20

**Tabela VI** - Grupo Normal - 12 MESES- Ingestão alimentar em g/12h - Evolução no seguimento.

n° animal	IN	4° dia	14° dia	6m	12m
815	25	25	20	15	20
816	30	30	25	25	25
817	30	25	20	35	25
818	25	30	30	30	20
819	30	30	25	35	30
820	25	30	30	19	30
821	30	25	25	10	30
822	25	30	25	10	30
823	25	25	30	35	25
825	30	30	25	30	30

**Tabela VII** - Grupo Diabético - 12 MESES - Diurese em ml/24h - Evolução no seguimento.

nº animal	IN	4º dia	14º dia	6m	12m
537	90	34	74	75	80
539	70	55	60	49	-
540	100	50	64	39	-
545	99	40	72	-	-
549	35	18	90	100	90
550	60	67	80	-	-
551	90	49	60	98	-
552	50	80	70	-	-
560	70	114	112	-	-
561	50	79	86	-	-
577	124	91	130	150	113
597	50	55	68	74	80
602	45	83	50	140	115
612	68	90	59	-	-
620	90	115	90	110	-
631	110	90	80	112	115
635	80	95	90	82	110
647	115	89	94	49	109
682	67	79	60	64	105
690	103	85	80	56	99

**Tabela VIII** - Grupo Normal - 12 MESES - Diurese em ml/24h - Evolução no seguimento.

nº animal	IN	4º dia	14º dia	6m	12m
815	21	20	15	8	5
816	12	10	11	8	5
817	21	12	10	10	2
818	20	18	15	10	1
819	19	15	12	10	3
820	15	18	15	10	10
821	19	17	10	15	9
822	20	21	20	9	10
823	13	10	15	12	11
825	20	20	15	12	13

**Tabela IX** - Grupo Diabético - 12 MESES - Glicemia em mg/dl - Evolução no seguimento.

n° animal	IN	4° dia	14° dia	6m	12m
537	421	280	333	382	460
539	410	480	510	550	-
540	395	410	495	390	-
545	350	440	500	-	-
549	280	435	224	372	672
550	349	430	450	-	-
551	325	460	500	520	-
552	330	460	450	-	-
560	310	390	550	-	-
561	345	370	390	-	-
577	313	365	472	514	152
597	202	289	218	125	280
602	195	323	225	444	323
612	360	330	490	-	-
620	359	270	350	500	-
631	398	290	300	318	480
635	371	301	308	340	501
647	380	270	299	315	486
682	290	315	340	510	559
690	319	428	450	433	492

**Tabela X** - Grupo Normal - 12 MESES - Glicemia em mg/dl - Evolução no seguimento.

n° animal	IN	4° dia	14° dia	6m	12m
815	112	135	110	100	80
816	135	120	85	100	87
817	128	114	100	86	112
818	112	115	120	116	100
819	116	114	110	100	83
820	110	111	115	100	92
821	105	103	107	110	84
822	115	110	112	97	97
823	119	109	117	85	85
825	102	100	107	106	81

**Tabela XI** - Grupo Diabético - 12 MESES - Glicose urinária em mg/dl - Evolução no seguimento.

nº animal	IN	4º dia	14º dia	6m	12m
537	4210	5899	7980	6414	4602
539	4368	6000	7021	6589	-
540	2190	5693	4759	5649	-
545	4570	3433	3468	-	-
549	3590	4430	4999	5143	4999
550	2295	4543	3990	-	-
551	3202	4404	5570	5905	-
552	2190	3094	5915	-	-
560	3643	3490	5905	-	-
561	3324	4750	4300	-	-
577	2284	4473	5430	5732	5813
597	3199	5732	4999	5601	3455
602	2795	5282	4999	4182	3900
612	2905	5100	5805	-	-
620	3605	4906	5019	6495	-
631	3790	4320	4880	4698	4908
635	3504	4001	4809	4880	4991
647	3225	3806	4003	4430	4739
682	3009	3807	4198	4047	5082
690	2905	3018	3321	3949	4009

**Tabela XII** - Grupo Normal - 12 MESES - Glicose urinária em mg/dl - Evolução no seguimento.

nº animal	IN	4º dia	14º dia	6m	12m
815	10	11	6	10	8
816	9	11	11	8	9
817	9	4	4	10	11
818	11	9	10	11	11
819	9	11	7	12	17
820	8	9	9	7	10
821	10	11	9	11	8
822	9	11	7	6	9
823	10	8	6	6	9
825	8	10	8	7	10

**Tabela XIII** - Grupo Diabético - 12 MESES - proteinúria em mg/24horas - Evolução no seguimento.

nº animal	Volume urinário ml/24h	12m proteinúria mg/24h
537	80	0,0105
539	110	-
540	115	-
545	112	-
549	90	0,0620
550	110	-
551	100	-
552	89	-
560	96	-
561	89	-
577	113	0,0255
597	80	0,1430
602	115	0,0995
612	105	-
620	100	-
631	115	0,0495
635	110	0,0680
647	109	0,0655
682	105	0,1046
690	99	0,0227

**Tabela XIV** - Grupo Normal - 12 MESES - proteinúria em mg/24horas - Evolução no seguimento.

nº animal	Volume urinário ml/24h	12m proteinúria mg/24h
815	5	0,0041
816	5	0,0025
817	2	0,0018
818	1	0,0019
819	0,3	0,0006
820	10	0,0025
821	9	0,0014
822	10	0,0012
823	11	0,0015
825	13	0,0091

**Tabela XV.a. Rato diabético n°549.** Estudo morfométrico através da análise de Elétron-micrografias dos rins de ratos diabéticos, em sistema computadorizado para análise de imagens (Qwin Lite 2.5-Leica), avaliando os seguintes parâmetros: número de podócitos, número de "slit diafragm", espessura da membrana basal glomerular (MBG) em  $\mu\text{m}$  (micrômetro) e extensão do "slit diafragm" em  $\mu\text{m}$  (micrômetro).

Número da "Foto"	Número de Podócitos	Número de "slit diafragm"	Membrana Basal Glomerular (mm)			Extensão do "Slit diafragm" (mm)		
			Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo
1	6	3	0,253916	0,26471	0,241323	0,032382	0,03341	0,029041
2	7	5	0,448465	0,467997	0,43176	0,006939	0,008224	0,004112
3	13	11	0,319965	0,549723	0,295036	0,009766	0,016705	0,004112
4	7	3	0,330502	0,350034	0,283471	0,006939	0,008224	0,004112
5	8	4	0,268565	0,287583	0,240552	0,008481	0,009252	0,005911
6	7	2	0,534046	0,645327	0,532504	0,014649	0,021331	0,009252
7	11	5	0,587502	0,729623	0,428933	0,01542	0,022359	0,008224
8	8	2	0,245178	0,273705	0,220763	0,010537	0,011822	0,009252
9	6	3	0,315082	0,348492	0,253916	0,012593	0,020817	0,004112
10	9	6	0,310456	0,35466	0,281929	0,009766	0,018504	0,004112
11	9	4	0,327932	0,36237	0,299919	0,014392	0,018504	0,009252
12	9	4	0,482132	0,539186	0,408116	0,015163	0,030069	0,005911
13	12	2	0,44718	0,515028	0,346436	0,018504	0,018504	0,018504
14	8	3	0,441783	0,49601	0,384472	0,012593	0,016705	0,008224
15	10	2	0,435101	0,488814	0,343095	0,021331	0,024158	0,018504
16	6	3	0,256229	0,288868	0,222562	0,021588	0,024929	0,017219
17	7	4	0,274219	0,289125	0,248005	0,014906	0,017733	0,009252
18	6	3	0,509374	0,608576	0,284499	0,018504	0,030326	0,011822
19	5	0	0,323049	0,379846	0,292209	0	0	0
20	6	1	0,292209	0,368281	0,245692	0,017219	0,017219	0,017219
21	8	5	0,258542	0,334357	0,202259	0,023387	0,035209	0,012593
22	9	5	0,24929	0,279359	0,216651	0,021588	0,030069	0,013107
23	8	4	0,300947	0,336413	0,249804	0,03341	0,041634	0,014906
24	9	2	0,239267	0,290924	0,222819	0,019018	0,025443	0,012593
25	9	2	0,24415	0,273705	0,210483	0,022616	0,024158	0,020817
26	8	3	0,359029	0,408116	0,308657	0,016705	0,020817	0,012593
27	9	7	0,319708	0,396551	0,254173	0,015677	0,029555	0,008224
28	9	4	0,450778	0,604721	0,335642	0,0257	0,033667	0,020817

**Tabela XV.b. Rato diabético n° 597** Estudo morfométrico através da análise de Elétron-micrografias dos rins de ratos diabéticos, em sistema computadorizado para análise de imagens (Qwin Lite 2.5-Leica), avaliando os seguintes parâmetros: número de podócitos, número de “slit diafragm”, espessura da membrana basal glomerular (MBG) em  $\mu\text{m}$  (micrômetro) e extensão do “slit diafragm” em  $\mu\text{m}$  (micrômetro).

Número da “Foto”	Número de Podócitos	Número de “slit diafragm”	Membrana Basal Glomerular (mm)			Extensão “Slit diafragm” (mm)		
			Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo
1	10	6	0,183755	0,206628	0,163966	0,022873	0,031611	0,013107
2	8	4	0,249547	0,277817	0,226931	0,029298	0,032639	0,024929
3	12	6	0,276789	0,339754	0,216394	0,022873	0,029041	0,012593
4	6	3	0,350805	0,363141	0,331016	0,024672	0,031611	0,017733
5	9	4	0,264967	0,28784	0,237982	0,024672	0,030326	0,016705
6	10	7	0,256229	0,288868	0,226674	0,028784	0,041634	0,020817
7	7	4	0,298891	0,327932	0,270621	0,028527	0,033667	0,022359
8	11	7	0,242608	0,275247	0,208427	0,032382	0,038293	0,024929
9	9	7	0,511944	0,612431	0,443325	0,037522	0,048573	0,026214
10	10	6	0,273962	0,360057	0,242351	0,02827	0,037265	0,020817
11	10	6	0,240552	0,301718	0,204058	0,030326	0,046517	0,018504
12	12	6	0,262397	0,294522	0,241323	0,03341	0,047545	0,023644
13	7	4	0,234641	0,263425	0,207142	0,039835	0,047545	0,030069
14	9	5	0,454376	0,538929	0,396294	0,022616	0,025443	0,020817
15	9	4	0,407345	0,512715	0,335642	0,019018	0,021331	0,017219
16	11	4	0,290153	0,350291	0,21845	0,025443	0,029041	0,017733
17	9	3	0,295807	0,316624	0,271392	0,018504	0,022359	0,012593
18	10	4	0,433816	0,474679	0,406317	0,029555	0,037265	0,020817
19	5	2	0,487015	0,541756	0,435872	0,021074	0,023644	0,018504
20	10	8	0,238753	0,32639	0,200203	0,024158	0,033667	0,018504
21	8	4	0,43176	0,501921	0,364683	0,023644	0,028013	0,017733
22	8	4	0,301975	0,381131	0,254173	0,026728	0,029555	0,023644
23	9	4	0,295807	0,325105	0,253916	0,022873	0,028013	0,020817
24	11	6	0,36494	0,476221	0,272677	0,028527	0,031611	0,020817
25	7	5	0,171162	0,184783	0,154457	0,026985	0,033667	0,026985
26	8	3	0,201488	0,237725	0,150859	0,029041	0,035466	0,018504
27	4	1	0,245178	0,28784	0,192236	0,029555	0,029555	0,029555
28	5	2	0,235155	0,26214	0,192493	0,020817	0,024929	0,016705
29	8	2	0,206371	0,310456	0,151373	0,013107	0,016705	0,009252
30	7	3	0,252374	0,283214	0,219478	0,011308	0,017219	0,008224
31	7	3	0,18247	0,197376	0,16191	0,024415	0,024929	0,024158
32	9	6	0,263168	0,286812	0,238496	0,022873	0,037522	0,012593
33	5	1	0,291181	0,334357	0,253145	0,023644	0,023644	0,023644
34	7	3	0,231043	0,28784	0,204058	0,022873	0,026728	0,020817
35	5	2	0,32896	0,359029	0,280387	0,020817	0,023644	0,016705
36	7	3	0,205086	0,225132	0,184783	0,023387	0,030069	0,016705
37	8	5	0,30069	0,341553	0,271649	0,016705	0,021331	0,011822
38	7	3	0,283471	0,359286	0,209455	0,023644	0,025443	0,020817
39	9	5	0,232585	0,290924	0,186325	0,024929	0,032639	0,014906
40	12	7	0,23387	0,270621	0,183241	0,023644	0,033667	0,020817
41	6	2	0,227188	0,2827	0,187867	0,025186	0,029555	0,020817
42	6	1	0,28013	0,347464	0,217422	0,018504	0,018504	0,018504

**Tabela XV.c. Rato diabético nº 631.** Estudo morfométrico através da análise de Elétron-micrografias dos rins de ratos diabéticos, em sistema computadorizado para análise de imagens (Qwin Lite 2.5-Leica), avaliando os seguintes parâmetros: número de podócitos, número de “slit diafragm”, espessura da membrana basal glomerular (MBG) em  $\mu\text{m}$  (micrômetro) e extensão do “slit diafragm” em  $\mu\text{m}$  (micrômetro).

Número da “Foto”	Número de Podócitos	Número de “slit diafragm”	Membrana Basal Glomerular (mm)			Extensão “Slit diafragm” (mm)		
			Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo
1	9	5	0,262911	0,292209	0,202259	0,010794	0,017733	0,004112
2	9	5	0,285013	0,321764	0,247491	0,01799	0,021074	0,013107
3	12	5	0,239781	0,272677	0,199946	0,015934	0,026214	0,005911
4	10	9	0,273962	0,292209	0,245435	0,021845	0,035466	0,013107
5	8	5	0,280644	0,351062	0,245435	0,013364	0,020817	0,004112
6	8	5	0,274219	0,28784	0,255201	0,01542	0,020817	0,015677
7	8	4	0,417111	0,494725	0,358515	0,014906	0,020817	0,009252
8	8	3	0,430732	0,494725	0,399892	0,011308	0,013107	0,009252
9	8	5	0,327161	0,346179	0,303003	0,019018	0,029555	0,011822
10	9	6	0,392182	0,442297	0,345922	0,013621	0,021331	0,009252
11	8	5	0,276275	0,306344	0,243893	0,014392	0,018504	0,009252
12	9	3	0,276018	0,313026	0,233613	0,01028	0,013107	0,008224
13	5	2	0,310199	0,332301	0,283214	0,016705	0,024158	0,009252
14	9	4	0,4112	0,523252	0,324334	0,016448	0,026728	0,005911
15	8	2	0,29555	0,368795	0,250575	0,011565	0,014906	0,008224
16	8	6	0,315339	0,371108	0,264967	0,018504	0,030069	0,012593
17	10	8	0,413256	0,582362	0,296321	0,02056	0,028013	0,016705
18	7	4	0,465427	0,552807	0,304031	0,032896	0,041634	0,028013
19	10	5	0,464656	0,601637	0,387299	0,020046	0,029041	0,012593
20	8	3	0,44975	0,476992	0,410686	0,014906	0,020817	0,005911
21	9	5	0,467997	0,530448	0,407859	0,019275	0,025443	0,012593
22	6	3	0,60138	0,766117	0,351062	0,016705	0,025443	0,008224
23	9	5	0,272934	0,3084	0,191979	0,021845	0,03341	0,011822
24	8	3	0,40349	0,499865	0,350034	0,022102	0,029041	0,018504
25	8	3	0,359543	0,445381	0,290924	0,019532	0,020817	0,016705
26	7	3	0,310713	0,396294	0,262397	0,020817	0,031611	0,013107
27	9	7	0,509888	0,571054	0,450521	0,029041	0,044204	0,018504

**Tabela XV.d. Rato diabético n° 647** Estudo morfométrico através da análise de Elétron-micrografias dos rins de ratos diabéticos, em sistema computadorizado para análise de imagens (Qwin Lite 2.5-Leica), avaliando os seguintes parâmetros: número de podócitos, número de “slit diafragm”, espessura da membrana basal glomerular (MBG) em  $\mu\text{m}$  (micrômetro) e extensão do “slit diafragm” em  $\mu\text{m}$  (micrômetro).

Número da “Foto”	Número de Podócitos	Número de “slit diafragm”	Membrana Basal Glomerular (mm)			Extensão “Slit diafragm” (mm)		
			Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo
1	7	4	0,272934	0,33153	0,222562	0,024415	0,026728	0,020817
2	7	3	0,226674	0,246463	0,20046	0,016448	0,024158	0,008224
3	10	7	0,199689	0,242351	0,149317	0,016705	0,020817	0,013107
4	12	8	0,265224	0,291952	0,188895	0,016448	0,021331	0,012593
5	4	0	0,461829	0,54227	0,309942	0	0	0
6	10	7	0,221791	0,245178	0,204315	0,025957	0,033667	0,018504
7	8	6	0,210226	0,254944	0,169877	0,029298	0,035466	0,023644
8	8	5	0,432531	0,595983	0,273962	0,024158	0,032639	0,018504
9	9	7	0,272677	0,353375	0,219478	0,024158	0,044975	0,012593
10	12	8	0,401948	0,53199	0,314054	0,02056	0,030069	0,012593
11	7	5	0,289896	0,342324	0,258285	0,021331	0,026728	0,016705
12	8	4	0,357487	0,496524	0,240552	0,018504	0,022359	0,016705
13	11	7	0,32896	0,367253	0,290924	0,021588	0,025443	0,016705
14	12	9	0,389098	0,446409	0,311998	0,020817	0,030326	0,008224
15	6	3	0,303517	0,387042	0,206114	0,024158	0,033667	0,016705
16	11	6	0,389098	0,42405	0,353889	0,028784	0,038293	0,020817
17	7	3	0,309685	0,364169	0,244921	0,024158	0,026728	0,020817
18	7	4	0,421223	0,471081	0,404261	0,027242	0,037522	0,021331
19	6	3	0,237468	0,266766	0,216908	0,021845	0,026214	0,013107
20	8	4	0,319708	0,358001	0,299919	0,026471	0,030326	0,020817
21	5	3	0,256743	0,301461	0,220249	0,019789	0,023644	0,014906
22	7	3	0,263425	0,310199	0,24158	0,020303	0,022359	0,017219
23	7	4	0,253145	0,273962	0,236697	0,026471	0,031611	0,020817
24	7	4	0,305573	0,32639	0,270621	0,03598	0,048573	0,029555
25	8	2	0,209712	0,246206	0,174246	0,029812	0,034438	0,025443
26	9	5	0,228473	0,2827	0,175531	0,026214	0,034438	0,020817
27	7	2	0,255972	0,277817	0,24158	0,025186	0,029041	0,021331
28	8	5	0,429961	0,483931	0,397322	0,023901	0,030326	0,018504
29	6	3	0,309171	0,370594	0,267023	0,02056	0,028013	0,013107
30	6	2	0,346179	0,379846	0,322021	0,029812	0,030326	0,029041
31	7	3	0,248519	0,29812	0,214081	0,028527	0,033667	0,022359
32	6	2	0,301975	0,315082	0,269593	0,018761	0,020817	0,016705
33	6	2	0,381131	0,422251	0,341039	0,023644	0,026728	0,020817
34	5	1	0,366739	0,439984	0,285784	0,018504	0,018504	0,018504
35	7	2	0,293237	0,329731	0,259056	0,02827	0,031611	0,024929
36	4	1	0,361342	0,397322	0,338726	0,025443	0,025443	0,025443
37	6	1	0,39835	0,434073	0,343352	0,013107	0,013107	0,013107
38	6	3	0,285784	0,301718	0,265995	0,027242	0,030326	0,024929
39	7	4	0,260855	0,283214	0,239524	0,024672	0,030326	0,017219

Ratos diabéticos. (elétron-micrografias =136)

**Tabela XVI.a. Rato normal nº 818.** Estudo morfométrico através da análise de Elétron-micrografias dos rins de ratos normais, em sistema computadorizado para análise de imagens (Qwin Lite 2.5-Leica), avaliando os seguintes parâmetros: número de podócitos, número de “slit diafragm”, espessura da membrana basal glomerular (MBG) em  $\mu\text{m}$  (micrômetro) e extensão do “slit diafragm” em  $\mu\text{m}$  (micrômetro).

Número da “Foto”	Número de Podócitos	Número de “slit diafragm”	Membrana Basal Glomerular (mm)			Extensão “Slit diafragm” (mm)		
			Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo
1	10	6	0,245178	0,291438	0,20817	0,026985	0,041634	0,016705
2	11	4	0,239524	0,280644	0,200974	0,026214	0,030326	0,017219
3	12	9	0,212025	0,258285	0,154971	0,023644	0,034438	0,014906
4	9	4	0,246977	0,294265	0,167821	0,03084	0,039321	0,023644
5	12	8	0,16448	0,195834	0,138523	0,027499	0,034438	0,017219
6	11	9	0,165508	0,191979	0,144948	0,0257	0,032639	0,017219
7	8	3	0,34952	0,478791	0,230015	0,03084	0,037522	0,024929
8	13	9	0,171419	0,191465	0,150345	0,029555	0,037265	0,017733
9	11	7	0,136724	0,160882	0,117192	0,015677	0,020817	0,012593
10	12	6	0,181699	0,258542	0,113337	0,020303	0,026728	0,014906
11	11	3	0,139808	0,199432	0,121047	0,018504	0,022359	0,011822
12	12	5	0,126444	0,150859	0,092263	0,018504	0,024158	0,011822
13	13	9	0,162424	0,176816	0,139808	0,022873	0,044204	0,013107
14	12	7	0,162938	0,215366	0,132612	0,017219	0,026728	0,009252
15	13	7	0,155999	0,173218	0,139551	0,024158	0,031611	0,017219
16	10	5	0,144434	0,158312	0,125416	0,017733	0,021331	0,016705
17	11	6	0,219992	0,338983	0,150088	0,021331	0,034438	0,012593
18	12	7	0,162424	0,180157	0,147261	0,024158	0,028013	0,017733
19	10	6	0,188638	0,238496	0,147261	0,022102	0,026214	0,017219
20	11	9	0,264453	0,301718	0,245178	0,026985	0,038293	0,013107
21	11	8	0,218707	0,280644	0,14135	0,021074	0,029041	0,017219
22	11	6	0,152144	0,206114	0,125416	0,020303	0,026728	0,012593
23	10	9	0,126187	0,155485	0,102286	0,029041	0,035466	0,021331
24	11	8	0,188638	0,221277	0,148546	0,032382	0,047031	0,014906
25	10	6	0,245178	0,291438	0,20817	0,026985	0,041634	0,016705

**Tabela XVI.b. Rato normal n° 819** Estudo morfométrico através da análise de Elétron-micrografias dos rins de ratos normais, em sistema computadorizado para análise de imagens (Qwin Lite 2.5-Leica), avaliando os seguintes parâmetros: número de podócitos, número de “slit diafragm”, espessura da membrana basal glomerular (MBG) em  $\mu\text{m}$  (micrômetro) e extensão do “slit diafragm” em  $\mu\text{m}$  (micrômetro).

Número da “Foto”	Número de Podócitos	Número de “slit diafragm”	Membrana Basal Glomerular (mm)			Extensão “Slit diafragm” (mm)		
			Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo
1	11	7	0,192236	0,212796	0,171419	0,023387	0,03341	0,014906
2	10	3	0,23901	0,255201	0,216394	0,020303	0,028013	0,008224
3	8	3	0,34181	0,382673	0,313283	0,027242	0,037779	0,012593
4	11	5	0,206371	0,255458	0,169877	0,023901	0,026728	0,020817
5	13	11	0,181185	0,233356	0,127472	0,025957	0,033667	0,017219
6	10	6	0,188124	0,251603	0,147775	0,020303	0,033667	0,012593
7	12	6	0,257514	0,303774	0,21845	0,02313	0,032639	0,016705
8	9	4	0,198147	0,223076	0,178101	0,024415	0,028013	0,020817
9	11	3	0,229758	0,259827	0,17476	0,018761	0,022359	0,016705
10	11	8	0,309428	0,343866	0,276789	0,024415	0,03341	0,016705
11	11	5	0,242608	0,274733	0,207399	0,021845	0,026728	0,017219
12	11	9	0,22102	0,242351	0,206114	0,020817	0,032639	0,009252
13	7	3	0,248005	0,284756	0,180157	0,017476	0,021331	0,012593
14	12	4	0,357744	0,471081	0,263168	0,021588	0,035209	0,011822
15	13	6	0,324848	0,375734	0,265481	0,014906	0,018504	0,008224
16	12	4	0,229244	0,274733	0,150345	0,016448	0,024929	0,009252
17	13	8	0,211254	0,270107	0,165765	0,034952	0,038293	0,029041
18	13	10	0,237725	0,275761	0,1799	0,042919	0,061423	0,032639
19	8	7	0,22102	0,247491	0,21074	0,034181	0,047545	0,023644
20	11	10	0,243893	0,279873	0,175531	0,04626	0,053199	0,039321
21	11	10	0,222048	0,291695	0,189409	0,041634	0,056026	0,032639
22	13	9	0,171933	0,216394	0,125159	0,040863	0,057825	0,029041
23	13	12	0,228473	0,280644	0,184783	0,034438	0,044718	0,024929
24	12	10	0,23901	0,280387	0,191722	0,040092	0,049858	0,024929
25	12	8	0,291181	0,340782	0,248005	0,042919	0,058082	0,026728
26	11	9	0,27242	0,341039	0,218193	0,03855	0,04883	0,022359
27	11	8	0,303517	0,393724	0,208427	0,041891	0,044975	0,037779
28	12	8	0,164737	0,20303	0,1285	0,036751	0,045746	0,024929
29	11	10	0,207399	0,226417	0,192236	0,036494	0,046517	0,026214
30	12	10	0,256229	0,304288	0,225646	0,037779	0,046517	0,026728
31	9	6	0,310199	0,354146	0,270107	0,037008	0,044204	0,029041

**Tabela XVI.c. Rato normal n°821.** Estudo morfométrico através da análise de Elétron-micrografias dos rins de ratos normais, em sistema computadorizado para análise de imagens (Qwin Lite 2.5-Leica), avaliando os seguintes parâmetros: número de podócitos, número de “slit diafragm”, espessura da membrana basal glomerular (MBG) em  $\mu\text{m}$  (micrômetro) e extensão do “slit diafragm” em  $\mu\text{m}$  (micrômetro).

Número da “Foto”	Número de Podócitos	Número de “slit diafragm”	Membrana Basal Glomerular (mm)			Extensão “Slit diafragm” (mm)		
			Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo
1	13	6	0,276018	0,324848	0,238239	0,033153	0,054227	0,021331
2	12	8	0,174246	0,216651	0,141607	0,035466	0,041634	0,028013
3	12	9	0,193778	0,214081	0,175017	0,042662	0,054227	0,031611
4	10	9	0,261369	0,294522	0,217165	0,033924	0,037779	0,030326
5	10	8	0,215366	0,280644	0,164223	0,033924	0,038293	0,026214
6	13	9	0,164994	0,208427	0,147518	0,035209	0,046003	0,026214
7	13	7	0,194035	0,216137	0,17476	0,029298	0,042405	0,021331
8	12	7	0,276018	0,323306	0,209198	0,030069	0,033667	0,016705
9	10	8	0,23644	0,255715	0,201745	0,030069	0,038293	0,024158
10	10	5	0,28784	0,355945	0,233099	0,037008	0,041891	0,029041
11	10	3	0,249033	0,301718	0,213053	0,03341	0,037779	0,029555
12	10	6	0,252888	0,279873	0,216394	0,035209	0,044718	0,026214
13	13	7	0,22873	0,259313	0,184783	0,028784	0,034438	0,020817
14	11	9	0,243893	0,26471	0,214338	0,040606	0,052171	0,031611
15	10	6	0,163709	0,175788	0,151373	0,025186	0,035466	0,014906
16	11	8	0,301461	0,351062	0,224104	0,03084	0,044204	0,024158
17	11	8	0,248519	0,299919	0,198918	0,033153	0,043433	0,024158
18	11	9	0,289125	0,316624	0,266509	0,028784	0,033667	0,020817
19	10	5	0,274219	0,386014	0,230015	0,031611	0,047545	0,020817
20	10	6	0,254173	0,340268	0,18504	0,033153	0,054741	0,021331
21	9	6	0,21331	0,283728	0,183241	0,022616	0,028013	0,012593
22	10	7	0,206885	0,265481	0,170648	0,026214	0,033667	0,017219
23	9	6	0,191979	0,220763	0,173989	0,036237	0,050629	0,020817
24	13	10	0,203544	0,247491	0,144948	0,037008	0,046517	0,029041
25	11	8	0,269079	0,319194	0,205086	0,028527	0,037265	0,016705
26	12	8	0,229244	0,276018	0,198918	0,031868	0,041634	0,025443

**Tabela XVI.d. Rato normal n° 823** Estudo morfométrico através da análise de Elétron-micrografias dos rins de ratos normais, em sistema computadorizado para análise de imagens (Qwin Lite 2.5-Leica), avaliando os seguintes parâmetros: número de podócitos, número de “slit diafragm”, espessura da membrana basal glomerular (MBG) em  $\mu\text{m}$  (micrômetro) e extensão do “slit diafragm” em  $\mu\text{m}$  (micrômetro).

Número da “Foto”	Número de Podócitos	Número de “slit diafragm”	Membrana Basal Glomerular (mm)			Extensão “Slit diafragm” (mm)		
			Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo
1	11	7	0,274219	0,290924	0,242608	0,023644	0,033667	0,018504
2	10	2	0,24158	0,276018	0,198404	0,025186	0,026728	0,023644
3	10	9	0,225903	0,255458	0,200203	0,021331	0,029555	0,012593
4	12	7	0,271649	0,316624	0,214852	0,028527	0,038293	0,020817
5	8	3	0,30069	0,410172	0,238496	0,022873	0,030069	0,017733
6	13	9	0,24929	0,319194	0,193778	0,024158	0,037265	0,017733
7	11	6	0,240552	0,276789	0,21074	0,022873	0,030069	0,014906
8	12	9	0,231814	0,337441	0,134154	0,029041	0,033667	0,022359
9	12	3	0,221791	0,243893	0,184526	0,024415	0,035466	0,017219
10	9	7	0,285527	0,335642	0,254173	0,031611	0,042919	0,021331
11	12	7	0,309171	0,246977	0,167307	0,032896	0,055512	0,022359
12	8	3	0,238753	0,273705	0,187353	0,018761	0,020817	0,016705
13	11	4	0,215366	0,283214	0,133126	0,032382	0,038293	0,024929
14	12	9	0,239267	0,265738	0,222819	0,041634	0,054227	0,028013
15	9	8	0,293237	0,341553	0,241323	0,034952	0,052171	0,018504
16	11	8	0,278588	0,356973	0,214081	0,034438	0,047545	0,016705
17	13	12	0,202773	0,234898	0,165251	0,043176	0,054227	0,029041
18	8	6	0,222819	0,24158	0,195834	0,040349	0,0514	0,026728
19	10	7	0,255201	0,280901	0,21845	0,035209	0,044975	0,022359
20	10	7	0,235669	0,286041	0,177587	0,032639	0,044204	0,026214
21	10	6	0,251346	0,290667	0,217165	0,034438	0,045746	0,029041
22	10	7	0,222819	0,300433	0,167564	0,041891	0,054741	0,030069
23	9	5	0,17733	0,204829	0,155485	0,045232	0,058339	0,039321
24	9	6	0,230786	0,258542	0,199946	0,029812	0,038293	0,024929
25	10	7	0,306087	0,360828	0,26214	0,037779	0,046003	0,029041
26	8	6	0,203287	0,24158	0,179129	0,034695	0,046517	0,029555
27	9	7	0,254687	0,29298	0,199946	0,037008	0,04112	0,031611
28	10	7	0,226674	0,279873	0,194292	0,039578	0,05654	0,031611
29	13	11	0,284756	0,403233	0,179643	0,031097	0,044204	0,020817
30	7	5	0,165508	0,176045	0,132355	0,031868	0,049858	0,017219
31	9	6	0,25957	0,389098	0,206628	0,034438	0,046517	0,024158
32	12	10	0,262397	0,371365	0,188381	0,029041	0,03598	0,017219
33	14	13	0,184526	0,21331	0,157541	0,036237	0,058853	0,020817

Ratos normais. (elétron-micrografias = 115)