

Carla Albertina Martins Almeida

Avaliação ultra-estrutural dos vasos da íris,
corpo ciliar e retina em ratos diabéticos
aloxânicos.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu da
Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título
de Doutor em Cirurgia (Área de Concentração: Bases Gerais da
Cirurgia e Cirurgia Experimental)

Orientadora: Prof. Titular Silvana Artioli Schellini

BOTUCATU
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Almeida, Carla Albertina Martins.

Avaliação ultra-estrutural dos vasos da íris, corpo ciliar e retina de ratos diabéticos aloxânicos / Carla Albertina Martins Almeida. – 2008.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Silvana Artioli Schellini

Assunto CAPES: 40102033

1. Diabetes. 2. Íris (olhos). 3. Retina – Vasos sanguíneos. 4. Rato como animal de laboratório.

CDD 617.71

Palavras-chave: Aloxana; Diabetes; Ratos; Ultra-estrutura; Vasos.

A Deus e a meus pais, Cida e Carlos, sempre presentes em minha vida.

Ao meu marido, Armando, por apoiar e incentivar.

Ao meu irmão, Moacir, sempre disponível, paciente e carinhoso.

A Dra. Silvana, mais que orientadora, amiga para todas as horas.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Titular Silvana Artioli Schellini para quem o tempo se multiplica, as atenções se redobram e a competência flui como um rio perene e, sem a qual os frutos deste trabalho não existiriam, meus mais sinceros agradecimentos e estima.

À Prof. Dra. Elisa Aparecida Gregório, pela orientação nas análises dos resultados histológicos.

Ao Dr. Roberto Augusto de Almeida Torres Júnior, pela execução e orientação nas análises estatísticas.

À Maria Helena Moreno, funcionária do laboratório de Microscopia Eletrônica, responsável pelos trabalhos de preparo do material e micrografias das áreas de estudo, que sempre manteve o profissionalismo e nos incentiva com seu exemplo de dedicação.

Aos funcionários do laboratório de Microscopia Eletrônica, Maria Euleda Lino Peres e Nivalde Antônio Bassa, pelo apoio prestado em certas fases do trabalho.

Aos funcionários da Cirurgia Experimental, Irene, Cecília e Sônia, pelos cuidados com os animais objetos deste estudo.

Aos funcionários:

- Setor de pós-graduação: Regina Célia Spadin, Lílían Cristina N. B. Nunes, Nathanael Pinheiro Sales, Vera Lúcia Aparecida Miguel, Adenice Ruiz Pedro;

- Departamento de Cirurgia: Simone Barroso Corvino Camargo;
- Biblioteca: Rosemeire Aparecida Vicente

Pelo tratamento atencioso dispensado durante todos estes anos, desde o início da realização do Mestrado, o meu muito obrigada.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus agradecimentos.

“Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar, para atravessar o rio da vida; ninguém, exceto tu, só tu. Existem, por certo, atalhos sem números, e pontes, e semideuses que se oferecerão para levar-te além do rio; mais isto te custaria tua própria pessoa; tu te hipotecarias e te perderias. Existe no mundo um único caminho por onde só tu podes passar. Onde leva? Não perguntes, segue-o!”.

Nietzsche

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	08
1-DIABETES E VISÃO	10
2-AS DESCOBERTAS E O DIABETES	13
3-ESTUDOS EXPERIMENTAIS E EM HUMANOS PARA ENTENDIMENTO DA DOENÇA DIABÉTICA	14
4-FISIOPATOLOGIA E ESTUDOS MORFOLÓGICOS DAS LESÕES OCULARES NO DIABETES	15
5-APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS EM ESTUDOS MORFOLÓGICOS	22
JUSTIFICATIVA DA PROPOSTA	24
OBJETIVOS	26
MATERIAL E MÉTODO	28
1. Animais utilizados	28
2. Grupos experimentais	28
3. Momentos experimentais	28
4. Parâmetros estudados	29
4.1. Parâmetros clínicos	29
4.2. Parâmetros bioquímicos	29
4.3 Parâmetros morfológicos	30
5. Método empregado para medida da espessura da membrana basal	30
6. Seqüência dos tempos experimentais	32
7. Técnicas utilizadas	32
7.1. Indução do diabetes experimental	32
7.2. Manutenção dos animais	33
7.3. Coleta de material para obtenção dos dados clínico laboratoriais	34
7.4. Exames bioquímicos	34
7.5. Sacrifício dos animais	35
7.6. Preparo dos olhos para exame morfológico	35
7.7. Documentação fotográfica	37
8. Análise estatística	38
RESULTADOS	40
1. Avaliação clínica	40
2. Parâmetros clínicos	41
2.1. Peso	41
2.2. Diurese	43
2.3. Ingestão hídrica	44
2.4. Ingestão alimentar	45
3. Parâmetros bioquímicos	46
3.1. Glicemia	46
3.2. Glicose urinária	47
4. Avaliação ultra-estrutural	48
4.1. Grupo controle	48
4.2. Grupo diabético	54
5. Análise morfométrica da espessura da membrana basal	59
FIGURAS	64
DISCUSSÃO	87
CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
SUMÁRIO	114
ABSTRACT	115

INTRODUÇÃO

Diabetes é uma das mais antigas doenças conhecidas, aparecendo a frase '*the passing of too much urine*' em um manuscrito egípcio, escrito por volta de 1550 antes de Cristo [Aretaeus (81-138 A.D.) De diabete Paris, 1554].

Na realidade, o diabetes é um grupo de síndromes, caracterizadas por hiperglicemia. É uma doença sistêmica, crônica e evolutiva, que ocorre por deficiência absoluta ou relativa da secreção de insulina, resistência celular à ação deste hormônio, ou a combinação destes dois fatores. Ocasiona mudanças no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas com alto risco de complicações vasculares (1-3).

Característica quase patognomônica do diabetes, conseqüente de todas as alterações metabólicas, é o espessamento da membrana basal capilar, com inadequado fluxo sangüíneo em certas regiões críticas do organismo, levando a alterações decorrentes da macroangiopatia e da microangiopatia (4-10).

Alterações decorrentes da macroangiopatia são: doença arterial coronariana, doença vascular periférica (pé diabético) e doença arterial cerebrovascular. Essas ocorrências podem atingir não diabéticos. No entanto, a

prevalência de infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral (AVC) é maior que o dobro em indivíduos diabéticos, quando comparada a populações não diabéticas (11).

Além disso, a taxa de mortalidade por IAM e AVC é respectivamente 50% e 15% maior em diabéticos, sendo que as doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte em pacientes diabéticos do Tipo 2 (12, 13).

As principais alterações decorrentes da microangiopatia são a nefropatia, a neuropatia e a retinopatia (8, 14).

A nefropatia diabética (ND) ocorre devido ao espessamento da membrana basal dos capilares dos glomérulos e, também, devido aos depósitos de glicoproteínas no mesângio, levando a nefroesclerose (7, 8, 11, 15). A maioria dos casos de ND apresenta também HA. Esta tem particularidades, quando presente em um ou outro tipo de DM. No tipo 2, a HA faz parte do espectro da síndrome metabólica, estando presente em cerca de 50% dos pacientes no momento do diagnóstico do DM. Já, no DM tipo 1, a HA manifesta-se tardiamente, associando-se ao aparecimento da microalbuminúria, e torna-se mais intensa e freqüente à medida que a nefropatia progride para as fases de macroproteinúria e diminuição da função renal (5, 8, 15).

A neuropatia diabética é complicação freqüente e precoce do DM, podendo atingir, em longo prazo, 80 a 100% dos pacientes, podendo já estar

presente nos pacientes com DM tipo 2 desde o momento do diagnóstico. O quadro clínico pode variar desde formas assintomáticas, até a presença de muitas manifestações pouco específicas, somáticas e/ou autonômicas. As alterações mais comuns são as sensoriais, com perda das sensibilidades dolorosa e térmica (8, 11). Ainda não foram inteiramente definidos os mecanismos patogênicos precisos, responsáveis pelas diferentes manifestações da neuropatia diabética. Todavia, há evidências que implicam vários processos diferentes no seu desenvolvimento. Os fatores mais importantes parecem ser a alteração da via metabólica dos polióis e também a isquemia, com redução do fluxo sanguíneo endoneural (8).

Estudos mostram que é necessário avaliar os vasos retinianos, de homens e de animais, para se conhecer a gênese das doenças vasculares (16), sendo a retinopatia diabética (RD) um dos pontos mais importantes da microangiopatia.

1-DIABETES E VISÃO

O diabetes é importante causador de doença ocular, e a perda permanente da visão é uma das complicações mais surpreendentes e temidas. Cerca de 25% de todos os novos casos de cegueira são atribuídos ao diabetes (17).

Praticamente todas as estruturas oculares podem ser acometidas pelo diabetes (18, 19), que é uma das poucas doenças sistêmicas com este potencial efeito deletério sobre os olhos e a visão (6, 19).

Apesar de a doença diabética afetar quase todas as estruturas oculares, são as alterações retinianas as mais temidas pelo fato de causarem perda da visão, de maneira progressiva e irreversível, mesmo quando se usa corretamente o tratamento.

A prevalência de RD em diabéticos difere conforme o tipo de doença, sendo que 40% dos indivíduos insulino-dependentes (DID) podem apresentar o problema, enquanto que apenas 20% dos diabéticos não insulino-dependentes (DNID) possuem RD. A prevalência de RD tem relação ainda com outros fatores, como a faixa etária e o sexo. Assim, indivíduos entre 30-65 anos e do sexo feminino são afetados com maior frequência.

Duke-Elder afirma que sua evolução é previsível, porém não prevenível, e o considera relativamente intratável. Afeta jovens ou idosos e, com sua evolução arrastada e progressiva, a RD leva à cegueira em grande porcentagem dos casos (20, 21).

A RD é a segunda causa de cegueira irreversível, precedida apenas pela degeneração macular relacionada com a idade (22). É a principal causa de cegueira entre 25 e 75 anos de idade (22, 23).

A RD é, também, importante indício prognóstico. Cinquenta por cento dos indivíduos com RD possuem alterações renais, e a sobrevida média de portadores de RD proliferativa é de cinco anos (24, 25).

A ausência de retinopatia pode ser correlacionada com o aumento da sobrevida dos diabéticos (26).

Os fatores de risco conhecidos são:

1) Duração do diabetes: é o fator mais importante. Depois de 10 anos de doença, a incidência é de 50%, e depois de 30 anos, é de 90% (27). O maior tempo de evolução do DM, leva também ao aumento dos casos de RD proliferativa (28, 29).

2) Controle metabólico: a manutenção de uma normoglicemia não previne o aparecimento da doença, mas pode retardá-la por alguns anos. Realmente, não é raro observarmos a progressão da retinopatia, a despeito da normalização da glicemia. É como se a retinopatia adquirisse um caráter autonômico na sua evolução (27, 30). Existe forte associação entre o grau do controle metabólico e o desenvolvimento de retinopatia com potencial piora da visão (29, 31, 32).

3) Fatores diversos: outros fatores que podem alterar o prognóstico são: gravidez, anemia, hipertensão arterial sistêmica, tabagismo,

hipomagnesemia, dislipidemia, puberdade e doença renal (proteinúria franca) (27, 30, 33).

Embora não haja um consenso absoluto na classificação da RD, diversos autores apresentam propostas de classificar a RD de acordo com fatores clínicos, prognósticos ou diagnósticos (34-38).

Bastante utilizada é a classificação em: retinopatia não proliferativa ou “background”, retinopatia proliferativa e maculopatia diabética (6, 37, 39-44).

2-AS DESCOBERTAS E O DIABETES

Johann Brunner (1653-1727) esteve perto de descobrir que o diabetes apresenta relação com o pâncreas. Ele removeu o pâncreas de cães e notou que eles apresentavam extrema sede e poliúria. Estes são os primeiros experimentos com relação à secreção interna do pâncreas (45).

Matthew Dobson (1731-1784) graduou-se em Edimburgh em 1756 e, foi o primeiro a provar a presença de açúcar na urina de pacientes com diabetes, após evaporação. Também fez observações cruciais quanto ao excesso de açúcar no sangue e demonstrou que o diabetes é uma doença sistêmica e não primária dos rins como se pensava anteriormente (45).

Thomas Cawley foi o primeiro a sugerir correlação entre diabetes e pâncreas, após verificar que um paciente morto com diabetes apresentava sinais de dano tecidual pancreático. O significado desta pista vital não foi superado por cerca de cem anos (45).

3-ESTUDOS EXPERIMENTAIS E EM HUMANOS PARA ENTENDIMENTO DA DOENÇA DIABÉTICA

A relação da doença diabética com os olhos é importante, sendo a retina um dos focos principais dos estudos morfológicos, iniciados com Kuwabara e Cogan, que descreveram pela primeira vez as alterações senis nos vasos retinianos, com perdas endoteliais e pericíticas e o desenvolvimento de aneurismas saculares em homem com mais de 50 anos de idade.

Os estudos ultra-estruturais em animais de experimentação iniciaram-se com o cão, na década de 60 (46-48) e, depois com o rato, na década de 70 (49-51).

Atualmente existem modelos em camundongos (52), coelhos (53-55) e macacos (56).

Existem inúmeros modelos de ratos diabéticos para estudo da RD, utilizados por diferentes autores, tais como:

- alimentação com sucrose originando ratos diabéticos (57, 58).

- ratos com DM induzido por estreptozotocina (58, 59);
- ratos BB Wistar com diabetes espontâneo (60).
- ratos diabéticos aloxânicos, modelo descoberto pelo professor Shaw Dunn e o aprendiz Mc Letchie (61-65).
- ratos alimentados com galactose (65, 66).
- camundongos modificados por engenharia genética (63).

4-FISIOPATOLOGIA E ESTUDOS MORFOLÓGICOS DAS LESÕES OCULARES NO DIABETES

Os eventos patogênicos primários subjacentes às alterações da retinopatia “background” não proliferativa não são claros, mas a perda dos pericitos capilares de apoio, a proliferação endotelial e a hiperviscosidade com agregação das hemácias, isolados ou associados, foram todos propostos (6, 17, 40, 67-69).

A microangiopatia que afeta a retina é uma lesão que se estende por toda a microvasculatura (arteríolas, capilares e vênulas). Os aspectos básicos são de vazamento para os tecidos retinianos perivasculares e de oclusão (exclusão capilar), e ambos os eventos convergem para a isquemia do tecido retiniano. As primeiras manifestações microestruturais são o espessamento da membrana basal dos vasos e a diminuição do número de pericitos vasculares

(27). Com isso ocorre a fragilização estrutural da rede microvascular, gerando os microaneurismas e o extravasamento do conteúdo intravascular para o espaço perirretiniano.

Os microaneurismas são pequenas excrescências (15 a 50 micras de diâmetro) ao longo dos capilares e são particularmente proeminentes nas extremidades de áreas de não-perfusão capilar. Também pode haver aneurismas fusiformes ou dilatação generalizada das alças capilares. As veias retinianas são freqüentemente tortuosas e dilatadas; a dilatação pode ser segmentar, originando uma aparência "em contas" ou em "cordão de lingüiça". Os exsudatos podem ser de dois tipos: (1) exsudatos duros, céreos, variam de brancos a amarelados, brilhantes, com bordas definidas, mas sem pigmentação circundante. Esses exsudatos devem-se ao extravasamento de líquido contendo lipídios e proteínas dos capilares circundantes; (2) Os exsudatos algodonosos, ou moles, são realmente áreas de não-perfusão, representando microinfartos retinianos e freqüentemente são circundados por microaneurismas. Do ponto de vista clínico, o aumento das áreas algodonosas indica fechamento capilar progressivo e é um sinal de prognóstico sombrio (6, 17, 40, 67-69).

As hemorragias sub-retinianas tendem a ser pequenas, arredondadas e em forma de manchas, podendo ser reabsorvidas em algumas semanas. As hemorragias maiores em forma de chama de vela ocorrem nas camadas superficiais da retina e são reabsorvidas mais lentamente. As hemorragias pré-retinianas são mais graves e podem comprometer a visão se

forem grandes ou se invadirem a mácula. Após a reabsorção, pode ocorrer cicatrização e retração do vítreo ou descolamento da retina. O edema da retina deve-se à permeabilidade capilar anormal e isquemia. Quando existe edema macular persistente, a visão é gravemente prejudicada, e as formas comuns de tratamento (fotocoagulação) não são eficazes (6, 17, 40, 67-69).

A característica da retinopatia proliferativa é a formação de novos vasos ou neovascularização. Essas ramificações ou alças capilares podem crescer na superfície da retina ou estender-se para o vítreo. Com frequência, isto é acompanhado pela proliferação de elementos gliais na região do disco óptico ou ao longo das novas arcadas de vasos (6, 40, 70).

Finalmente, pode-se desenvolver tração entre o vítreo e os elementos neovasculares e gliais, levando ao descolamento da retina ou grande hemorragia no vítreo. Esses eventos levarão à grave perda da visão ou cegueira. Foi sugerido que a isquemia retiniana é o estímulo para a neovascularização retiniana e também no ângulo da câmara anterior e na íris, com liberação local de fatores promotores do crescimento (17).

A presença de mais de um achado dentre os seguintes: anormalidades venosas, anormalidades microvasculares intra retinianas, exsudatos algodonosos, evidência de não perfusão à angiografia fluoresceínica, podem indicar um estágio pré proliferativo, que aumenta a chance de proliferação fibrovascular (71).

Em pacientes com RD proliferativa, a não perfusão na periferia média em 50 a 75% desta área, a oclusão capilar nas regiões peripapilar, rafe temporal e nervo óptico, são fatores de risco para neovascularização no ângulo de drenagem do aquoso (72).

Existem estudos que demonstram o efeito protetor do glaucoma, miopia ou estenose unilateral de carótida sobre a RD e a piora do quadro após extração da catarata. Uma das hipóteses plausíveis para estas ocorrências pode ser a redução relativa da pressão intra-ocular, causada por persistente ou intermitente hiperglicemia, o que levaria a certas mudanças morfológicas no epitélio pigmentar retiniano (73).

No nervo óptico, o principal achado associado à RD proliferativa é a neovascularização do disco óptico (19). A neuropatia óptica aguda que ocorre nos diabéticos pode ser de dois tipos: neuropatia óptica isquêmica com atrofia óptica e as denominadas “papilites” (“papilopatia” diabética), além da neovascularização associada à RD proliferativa (40, 70).

Schellini, em 1992 estudou alterações morfológicas, ultra-estruturais e morfométricas dos capilares das camadas superficiais e profundas da retina de ratos diabéticos aloxânicos com idade entre 3 e 15 meses, observando estarem presentes lesões principalmente nos animais de 15 meses, melhor evidenciadas ao exame ultra-estrutural (64).

O enfoque para o mecanismo fisiopatogênico da RD nos estudos anatômicos é direcionado principalmente para os vasos retinianos (64, 74-76) e as demais camadas são menos valorizadas.

Entretanto, não só os vasos apresentam alterações estruturais e ultra-estruturais, como também demonstrado por Schellini, em 1992, onde foi observado que a camada de cones e bastonetes pode estar alterada em retinas de ratos diabéticos. Porém, estas alterações não foram especificadas ou quantificadas. Estas estruturas também apresentaram alterações importantes nos animais diabéticos, quando comparados a um grupo normal, com acompanhamento por 12 meses (77).

Outro estudo mostrou que os fotorreceptores tornam-se separados da coróide, resultando em diminuição da acuidade visual, descolamento da retina e morte celular (75).

Em 1969, foram relatadas alterações no epitélio pigmentar em humanos em estudo microscópico (78). Em estudo experimental, em ratos, foram verificadas alterações na ultraestrutura do epitélio pigmentar da retina e, através de morfometria, foram mensuradas as invaginações da membrana plasmática basal (79, 80).

Estudos anteriores mostraram que as células de Müller de retinas diabéticas apresentam alterações (61, 81). Em ratos diabéticos há, nas células de Müller, aumento de corpos “lisossomas like” e reação fosfatase ácida aumentada

em complexo de Golgi, retículo endoplasmático liso e corpos eletrodensos. O significado funcional destas alterações é incerto (81).

As células de Müller da retina diabética apresentam aumento da dispersão de cromatina, presença de granulações nucleares elétron-densas e aumento de glicogênio, corpos densos e lisossomas no citoplasma, principalmente nas células da região perivascular (61).

Outros vasos intra-oculares que não os retinianos, ou seja, os vasos do corpo ciliar e da íris são menos estudados. Porém, sendo o diabetes uma doença que atinge todos os vasos do organismo, os outros vasos oculares, como os localizados na coróide também se alteram, tendo sido observado espessamento da MB, perda de pericitos, vasodilatação, atrofia capilar, microaneurismas, usando ratos como modelo experimental, principalmente por terem estes animais curto ciclo de vida (61, 82, 83).

Alguns estudos ultra-estruturais, realizados em ratos Sprague-Dawley diabéticos, demonstraram alterações degenerativas nos pericitos perivasculares da retina, íris e coróide (84-86) .

Von Sallmann e Grimes encontraram em ratos diabéticos, a presença de dilatação de vasos irianos, além de aumento de vacuolização do epitélio pigmentar da íris devido ao acúmulo de glicogênio (87).

Kojima et al. (1971) também estudaram ratos diabéticos, tendo encontrado alterações nos vasos da coróide e da íris.

As células endoteliais de ratos diabéticos apresentam-se edemaciadas, com espessamento da MB, sendo possível observar neovasos irianos em estudos com preparações tripsínicas (50).

As alterações acometem também os músculos irianos de ratos diabéticos, que apresentam gotas lipídicas e aumento de corpos densos, dependentes da duração e controle da doença (88).

Estudo comparativo entre lesões de vasos retinianos e da íris, contrariamente ao esperado, mostraram que os pericitos não estão alterados nos animais de experimentação, como ocorre no ser humano (83).

Verificou-se alterações intensas nos nervos irianos de animais diabéticos, através de análise ultra-estrutural (89).

Também já foram verificadas alterações morfológicas nos vasos irianos, tais como: espessamento da membrana basal nas células endoteliais e pericitos, aumento dos corpos densos, alterações nas células musculares e fibroblastos perivasculares. Estas alterações ocorreram de maneira mais evidente em animais diabéticos, sendo verificadas através de microscopia eletrônica (90).

Poucos estudos experimentais foram realizados para avaliação das lesões ultra-estruturais diabéticas no corpo ciliar, sendo verificadas alterações

nas células endoteliais e nos pericitos (91, 92). Estes autores estudaram ratos diabéticos aloxânicos com seis meses de doença e encontraram alterações nas células do corpo ciliar.

Foram observadas alterações no estroma do corpo ciliar, semelhantes às decorrentes da senilidade, porém de ocorrência mais precoce e com caráter evolutivo, sendo visto, através de microscopia eletrônica: aumento de corpos densos e lisossomos em células endoteliais e pericíticas, espessamento da membrana basal do epitélio ciliar, degeneração em terminações nervosas amielínicas e sinais de degeneração em fibroblastos e em feixes nervosos perivasculares, em ratos diabéticos (93).

5-APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS EM ESTUDOS MORFOLÓGICOS

Nos estudos morfológicos realizados, é freqüente o uso de critérios subjetivos como a classificação de determinadas alterações em "leves, moderadas ou intensas", o que torna difícil a comparação de resultados e a reprodução de experimentos, impossibilitando a quantificação de elementos estruturais nas fotomicrografias eletrônicas de transmissão, fundamental para os estudos experimentais e anátomo-patológicos.

Estudos quantitativos são necessários para que as avaliações se tornem mais objetivas, tendo sido freqüente e crescente o uso da estereologia,

também chamada por alguns de morfometria, técnica que permite quantificar as mais variadas estruturas, sejam elas macro ou microscópicas (94-98).

A morfometria consiste em um conjunto de métodos de quantificação de estruturas morfológicas, sendo um instrumento valioso na avaliação de resultados de trabalhos experimentais (99-103).

Vários estudos têm mostrado a utilização de programas de desenho com ajuda do computador, como o AutoCAD (Autodesk, Inc. San Rafael, California), para realização de medidas diversas em animais e humanos (104-107). Em oftalmologia alguns trabalhos também tem sido feitos utilizando o AutoCad como método de medida (108, 109).

JUSTIFICATIVA DA PROPOSTA

Tendo em vista que:

- apesar de a doença diabética afetar todas as partes do olho, o enfoque das alterações vasculares diabéticas está voltado principalmente para a presença de lesões nos vasos retinianos;
- estudos de correlação entre alterações vasculares ocorrendo nos vasos irianos, do corpo ciliar e retina são praticamente inexistentes;
- estudos quantitativos para avaliação objetiva das alterações ultra-estruturais diabéticas são muito pouco realizados, justifica-se a realização do presente estudo experimental.

OBJETIVOS

- 1) Avaliar a ultra-estrutura dos vasos da íris, corpo ciliar e retina de ratos diabéticos aloxânicos de 1 e 12 meses, comparando-os com controles normais.
- 2) Analisar, quantitativamente, a espessura da membrana basal dos vasos da íris, corpo ciliar e retina de ratos diabéticos aloxânicos de 1 e 12 meses, comparando-os com controles normais.

MATERIAL E MÉTODO

Foi desenvolvido estudo experimental, de caráter prospectivo, seguindo os princípios para indução da doença diabética e avaliação dos animais preconizados pelo Grupo de Estudos do Diabetes Experimental -UNESP, Botucatu. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal - UNESP, protocolo No. 159 (27/11/2000).

1. ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 20 ratos da raça Wistar, de ambos os sexos, com idade de 3 meses, com peso de 200 a 300g. cada e sadios ao exame clínico. Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu – UNESP.

2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos, por sorteio, em 2 grupos experimentais, como segue:

- GRUPO CONTROLE (GC) - 10 ratos normais
- GRUPO DIABÉTICO (GD) – 10 ratos diabéticos, que não receberam qualquer tratamento

3. MOMENTOS EXPERIMENTAIS

Foi considerado, como momento zero (M0), o dia do sorteio dos ratos para os respectivos grupos experimentais, coincidente com o dia da indução

do diabetes, no GD e como momento1 (M1), o dia do início do seguimento dos animais, o que ocorreu 15 dias após M0.

Os demais momentos corresponderam aos dias de sacrifício dos animais e ocorreram como segue:

3.1- M2 – 1 mês após M1

3.2- M3 - 12 meses após M1

Foram sacrificados 5 ratos GC e 5 ratos GD em M2 e M3.

4. PARÂMETROS ESTUDADOS

4.1. PARÂMETROS CLÍNICOS

Diariamente, foram avaliados em todos os animais: comportamento, atividade, aspecto geral, peso (g), ingestão hídrica (ml/24 hs) e diurese (ml/24 hs).

4.2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Foi feita pesquisa diária (de manhã e à tarde) da glicosúria e da cetonúria; mensalmente, foram dosadas a glicemia de jejum (mg%) e a glicose urinária (mg%).

4.3. PARÂMETROS MORFOLÓGICOS

Os parâmetros morfológicos foram obtidos nos 20 animais, em cada um dos momentos experimentais.

Foram avaliados os vasos da íris, corpo ciliar e retina, usando microscopia eletrônica de transmissão, com avaliação quantitativa da espessura da membrana basal dos vasos e a relação entre grupos e momentos.

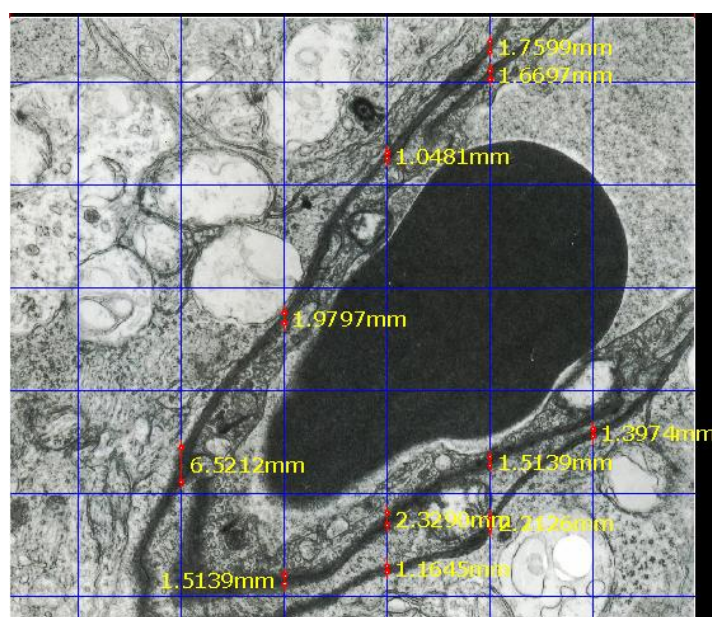
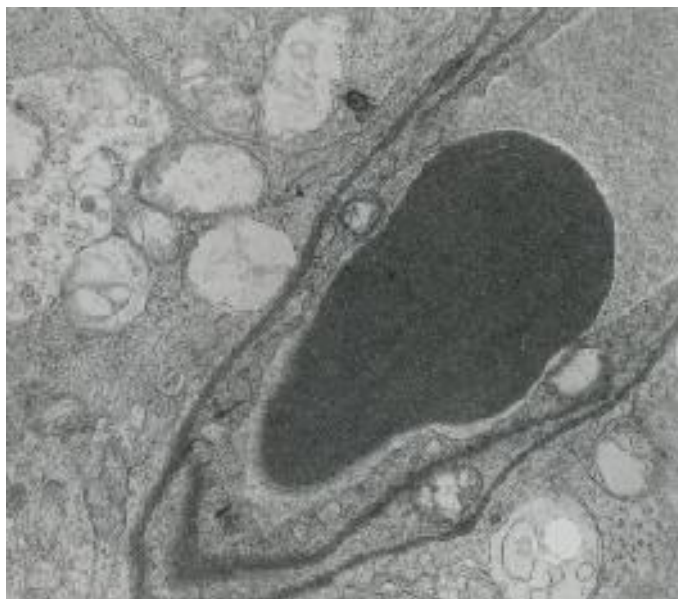
5. MÉTODO EMPREGADO PARA MEDIDA DA ESPESSURA DA MEMBRANA BASAL

As fotografias foram digitalizadas em um scanner HP® Scanjet 2400 para um computador Sony Vaio® VGN-T2XP / S. As medidas foram realizadas com a utilização do programa AutoCAD2004® (Autodesk, Inc. San Rafael, California).

O aumento das fotos dentro de cada grupo foi o mesmo e o tamanho das fotos escaneadas foi mantido em 1290 X 1150 mm. As medições obedeceram criteriosamente a metodologia aplicada que constou da utilização de um padrão quadriculado que foi sobreposto às fotografias digitalizadas, medindo-se a membrana basal nos locais de intersecção completa das linhas com toda a espessura da membrana, repetindo as medidas com as fotos nas posições

horizontal e vertical, no sentido de reduzir a variabilidade que poderia decorrer do efeito de corte não transversal do material.

Exemplo de medida:



6. SEQUÊNCIA DOS TEMPOS EXPERIMENTAIS

- Sorteio dos animais e administração de Aloxana 2% (J.T. Baker Chemical Co.), para indução do diabetes experimental (M0);
- Avaliação clínico-laboratorial quinze dias após M0;
- Avaliação clínico-laboratorial mensal a partir do M1;
- Observação diária do aspecto geral, da diurese, da ingestão hídrica, da glicosúria e da cetonúria a partir do M1;
- Sacrifício dos animais previamente anestesiados, de acordo com os momentos experimentais;
- Imediata enucleação dos olhos;
- Processamento de um dos olhos para exame ultraestrutural (foi determinado, por sorteio, o preparo dos olhos esquerdos).

7. TÉCNICAS UTILIZADAS

7.1. INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL

Para indução do diabetes, os ratos receberam injeção endovenosa de solução aquosa de Aloxana 2 % (2, 4, 5, 6 tetraoxohexahydropyrimidine), na dose única de 42 miligramas por quilograma de peso corporal.

Os animais foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas, recebendo água "*ad libitum*". A seguir, para facilitar a observação das veias caudais, cada animal foi colocado em caixa aquecida por lâmpada elétrica, por

cerca de 10 minutos. Daí, os ratos foram transferidos para uma pequena caixa de contenção, que permitiu que suas caudas ficassem expostas. Foi usada, então, uma agulha de calibre 13 x 4 (27G x 33/64) para administração da droga em uma das veias caudais. Trinta minutos após a injeção, os animais foram realimentados normalmente.

Após um período de 15 dias, necessário para definição dos animais portadores de diabetes grave, ou seja, os animais que apresentaram perda de peso, aumento da ingestão hídrica e do volume urinário, acompanhados de alterações laboratoriais de glicemia de jejum acima de 200 mg%, glicose urinária superior ou igual a 3.000 mg% e glicosúria positiva (+++) no teste de fitas reagentes foi iniciado o seguimento. Os animais que não preencheram os critérios adotados para definição de diabetes grave, foram descartados ou substituídos. Foram também substituídos os animais que vieram a morrer antes do período programado para o sacrifício.

7.2. MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram mantidos em caixas individuais no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, sob condições iguais de temperatura e iluminação.

Os ratos receberam ração Nuvilab CRI (Nuvital Nutrientes e Produtos Veterinários LTDA – PR) e água "*ad libitum*".

7.3. COLETA DE MATERIAL PARA OBTENÇÃO DOS DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS

As avaliações clínico-laboratoriais, foram realizadas quinze dias após a indução do diabetes e mensalmente, a partir de então, da seguinte forma:

- Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, durante 24 horas;
- Neste período foi fornecido volume conhecido de água e quantidade conhecida de ração Nuvilab - CR1;
- Após este período os animais entraram em jejum de 12 horas;
- No final do período de jejum, os animais foram pesados e avaliados os volumes, tanto de água ingerida (ml/24 hs), como de diurese (ml/24 hs);
- Coletadas amostras de 10 ml da urina de 24 horas para dosagem de glicose urinária (mg %), seguida da realização de glicosúria e cetonúria;
- Coletadas amostras de 1,5 ml de sangue para dosagem da glicose plasmática (mg %), cortando-se 0,2 mm da ponta da cauda de cada animal;
- Após a retirada do sangue, a cauda seccionada foi amarrada com fio de algodão 2.0.

7.4. EXAMES BIOQUÍMICOS

- Dosagem de glicose plasmática e urinária: realizadas, respectivamente, no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica e no Laboratório de Pesquisa Experimental do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, sendo empregado o método da Ortotoluidina (Dubowski, 1962).

- Pesquisa de glicose e de corpos cetônicos na urina: realizadas no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, sendo empregadas fitas reagentes Gluketur-test (Boehringer Mannheim M.B. Bioquímica LTDA-RJ).

7.5. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os animais foram colocados em cubas de vidro, e anestesiados utilizando-se éter sulfúrico (Tecnion Indústria Química LTDA-RS), administrado por via inalatória até a perda dos reflexos.

Após a anestesia, foi feita toracotomia, seguida de punção cardíaca para obtenção de amostras de sangue destinadas aos exames laboratoriais. A morte do animal ocorreu em função das alterações respiratórias, decorrentes da toracotomia, e da hipovolemia aguda provocada pela aspiração do sangue intracardíaco.

7.6 PREPARO DOS OLHOS PARA EXAME MORFOLÓGICO

7.6.1. Avaliação ultraestrutural

Após a enucleação, o olho esquerdo foi preparado para exame ultraestrutural como segue:

- Fixação em glutaraldeído 2,5 %, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3;
- Secção sagital do globo ao nível do equador, usando-se lâmina de barbear;
- Dissecção do globo ocular, com auxílio de pinças, sob lupa (Karl Zeiss) com aumento de 2,0 vezes;
- Separação das diversas estruturas oculares, com auxílio de 2 pinças delicadas;
- Recorte da área de estudo, em fragmentos de 3x1 mm, com lâmina de barbear, sobre cera de dentista rosa, em gota de solução fixadora;
- Coleta dos fragmentos, por meio de pipetas, sendo os mesmos recolocados em glutaraldeído 2,5 % por um período de 3 horas;
- Pós-fixação em ácido ósmico 1 % , em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3;
- Desidratação em série crescente de acetonas (50, 70, 90 e 100%);
- Mergulho dos fragmentos em mistura acetona/Araldite por 12 horas;

- Retirada dos fragmentos da mistura, e inclusão em bloco de resina Araldite pura por 1 hora, em estufa a 37° C, sendo preparados 6 blocos de cada local de estudo, de cada animal;

- Colocação em estufa a 60° C por 48 horas, para polimerização;

- Trimagem dos blocos, sob lupa, com auxílio de lâmina de barbear;

- Cortes semifinos, de 1/2 micron, que foram colocados sobre lâminas e corados com mistura de 1 : 1 de azul de metileno a 1 % e Azur II a 1 % ;

- Exame em microscópio óptico e escolha dos cortes semifinos apropriados;

- Cortes ultrafinos (500 Angstroms), feitos a partir dos cortes semifinos escolhidos;

- Exame em microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 301 .

7.7. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Foram obtidas, ao microscópio eletrônico de transmissão, micrografias das áreas de estudo. Para as eletromicrografias eletrônicas, foi utilizando o filme Ektacrome Kodak. O papel fotográfico utilizado foi o Kodacrome RC Print F3 Kodak.

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes aos parâmetros clínicos e bioquímicos obtidos no dia do sacrifício foram submetidos à análise estatística, utilizando-se a técnica da Análise de Variância para o modelo com dois fatores (grupo e momento), sendo o procedimento paramétrico, quando os dados apresentaram características da distribuição normal de probabilidade e não paramétrico, na ausência destas (Montgomery, 1991; Norman & Streiner, 1994).

Para apresentação dos resultados, considerou-se nas tabelas a significância apontada com letras, sendo que duas letras iguais mostram não significância e duas letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. As letras minúsculas comparam os grupos e as maiúsculas, os momentos dentro de um mesmo grupo.

Para os resultados das medidas de espessura da membrana basal, foi efetuada análise segundo delineamento inteiramente ao acaso com repetições (ratos). Os tratamentos consistiam de uma arranjo fatorial 2 x 2 de Grupo e Tempo. Além disso, em cada repetição foram feitas diversas medidas cujo número é variável de rato para rato. Dessa forma, o experimento não tem um teste exato como pode ser visto nas esperanças de quadrado médio (Expected Mean Squares), onde a composição dos efeitos a serem testados, à parte do componente do efeito em questão, não é exatamente a mesma do resíduo para o teste estatístico rato (grupo*tempo). Sendo assim todos os teste são aproximados (SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc®, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999).

RESULTADOS

1. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os animais tiveram comportamento bastante diferente nos dois grupos experimentais, sendo possível diferenciá-los pela simples observação do aspecto clínico. Os ratos do GC eram mais ativos, limpos e tranquilos que os ratos diabéticos. Os do grupo GD, eram apáticos, possuíam alterações na pelagem como queda de pelos, pelos eriçados, com pouco brilho, muitas vezes com presença de pediculose, piodermites e com coloração amarelada devido ao fato de que o rato não executava o ritual de limpeza, como o fazem os ratos normais.

Os ratos do GD também tomavam mais água, apresentavam dor à manipulação, urinavam mais e a urina possuía odor fétido. Além disso, cresciam menos e eram mais magros que os do GC, principalmente nos meses iniciais de seguimento.

Os ratos do GC dificilmente morreram espontaneamente durante o seguimento. Já, os do GD morriam mais facilmente, principalmente no período logo após a indução do diabetes ou no início do experimento. Observou-se, ainda, que alguns animais do GD logo após a indução do diabetes ou no início do

experimento apresentaram reversão do estado diabético espontaneamente. Nas duas situações, estes animais foram desprezados e/ou substituídos.

2. PARÂMETROS CLÍNICOS

2.1. Peso

Comparando-se GC no M2 com GC no M3, os animais tiveram média de peso semelhante nos dois momentos experimentais. Também os animais do GD apresentaram média de peso semelhantes no M2 e no M3.

Os valores médios do peso de ratos do GC foram superiores aos do GD no M2. Já no M3, os dois grupos apresentaram média de peso estatisticamente semelhante, apesar do GC ter apresentado valor médio superior ao GD (Tabela 1).

Tabela 1 - Média e desvio-padrão dos valores de peso (g) dos ratos dos dois grupos experimentais, nos momentos de sacrifício e respectivos resultados do teste estatístico.

GRUPO	MOMENTO	
	M2	M3
GC	329,50 ± 21,91 b A	314,03 ± 32,77 a A
GD	228,57 ± 29,97 a A	264,16 ± 58,97 a A

GC= Grupo Controle

M2 = 1 mês após M1

Letras maiúsculas comparam momentos

GD= Grupo Diabético

M3 = 12 meses após M1

Letras minúsculas comparam grupos

p<0,05



Figura 1 – Aspecto clínico de rato do grupo controle em M2.



Figura 2 – Aspecto clínico de rato do grupo controle em M3.

Figura 3 – Aspecto clínico de rato diabético em M2.



Figura 4 – Aspecto clínico de rato diabético em M3.



2.2. Diurese

Comparando-se os valores da Mediana de diurese dos animais do GC, assim como os do GD, não houve diferença estatística significativa nos dois momentos estudados.

A comparação dos animais do GC com os do GD, mostrou valores muito superiores de diurese nos do GD, com diferença estatística significativa nos dois momentos estudados (Tabela 2).

Tabela 2 – Mediana e semiamplitude total dos valores de diurese (ml/24hs) dos ratos dos dois grupos experimentais, no dia do sacrifício e respectivos resultados do teste estatístico.

GRUPO	MOMENTO	
	M2	M3
GC	6,63 ± 3,75 a	5,75 ± 2,47 a
GD	A	A
	77,00 ± 34,88 b	73,75 ± 20,38 b
	A	A

GC= Grupo Controle

M2 = 1 mês após M1

Letras maiúsculas comparam momentos

GD= Grupo Diabético

M3 = 12 meses após M1

Letras minúsculas comparam grupos

p<0,05

2.3. Ingestão hídrica

Quando comparados animais de GC em M2 e M3 e de GD em M2 e M3, os valores médios de ingestão hídrica foram semelhantes em ambos os grupos.

Porém, a comparação da ingestão hídrica dos animais do GD com os do GC, mostrou valores bastante superiores no GD, nos dois momentos de estudo (Tabela 3).

Tabela 3 - Média e desvio padrão dos valores de ingestão hídrica (ml/24hs) dos ratos dos dois grupos experimentais, no dia do sacrifício e respectivos resultados do teste estatístico.

GRUPO	MOMENTO	
	M2	M3
GC	46,70 ± 9,07 a	27,93 ± 8,266 a
	A	A
GD	116,10 ± 31,56 b	98,89 ± 21,69 b
	A	A

GC= Grupo Controle

M2 = 1 mês após M1

Letras maiúsculas comparam momentos

GD= Grupo Diabético

M3 = 12 meses após M1

Letras minúsculas comparam grupos

p<0,05

2.4. Ingestão alimentar

Quando comparados animais de GC em M2 e M3 e de GD em M2 e M3, os valores foram semelhantes.

Os animais do GD tiveram valores médios superiores de ingestão alimentar quando comparados aos do GC, tanto em M2, como em M3. (Tabela 4).

Tabela 4 - Média e desvio padrão dos valores de ingestão alimentar (gramas) dos ratos dos dois grupos experimentais, no dia do sacrifício e respectivos resultados do teste estatístico.

GRUPO	MOMENTO	
	M2	M3
GC	24,50 ± 6,03 a	12,25 ± 8,27 a
GD	A	A
	37,75 ± 10,98 b	25,29 ± 4,09 b
	A	A

GC= Grupo Controle

M2 = 1 mês após M1

Letras maiúsculas comparam momentos

GD= Grupo Diabético

M3 = 12 meses após M1

Letras minúsculas comparam grupos

p<0,05

3. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

3.1. Glicemia

A Mediana da glicemia dos animais do GC foi semelhante nos dois momentos experimentais. A comparação dos valores medianos da glicemia nos animais do GD mostrou que no M2 os valores foram superiores aos observados no M3.

Comparando-se GC com GD em ambos os momentos experimentais, os animais diabéticos apresentaram valores superiores aos do GC, com diferença estatística significativa (Tabela 5).

Tabela 5 - Mediana e semiamplitude total dos valores da glicemia (mg%) dos ratos dos dois grupos experimentais, nos momentos de sacrifício e respectivos resultados do teste estatístico.

GRUPO	MOMENTO	
	M2	M3
GC	114,75 ± 9,50 a	107,88 ± 10,00 a
GD	A 514,33 ± 104,88 b	A 362,29 ± 63,44 b
	B	A

GC= Grupo Controle

M2 = 1 mês após M1

Letras maiúsculas comparam momentos

GD= Grupo Diabético

M3 = 12 meses após M1

Letras minúsculas comparam grupos

p<0,05

3.2. Glicose urinária

A Mediana da glicose urinária dos animais do GC, assim como dos do GD, foi semelhante nos dois momentos de estudo.

Comparando-se animais do GC com GD, os valores obtidos nos animais do GD foram muito acima dos observados no GC, em ambos os momentos experimentais (Tabela 6).

Tabela 6 - Mediana e semiamplitude total dos valores de glicose urinária (mg%) dos ratos dos dois grupos experimentais, nos momentos de sacrifício e respectivos resultados do teste estatístico.

GRUPO	MOMENTO	
	M2	M3
GC	16,00 ± 3,13 a	25,00 ± 45,65 a
GD	A	A
	5658,75 ± 1980,59 b	5474,38 ± 2182,13 b
	A	A

GC= Grupo Controle

M2 = 1 mês após M1

Letras maiúsculas comparam momentos

GD= Grupo Diabético

M3 = 12 meses após M1

Letras minúsculas comparam grupos

p<0,05

4. AVALIAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL

4.1. Grupo controle

4.1.1. GC – M2

4.1.1.1. Íris (Figuras 5, 6 e 7).

Os vasos da íris foram observados distribuídos por todo o estroma. Tratam-se, em geral, de arteríolas e vênulas, havendo também capilares. São vasos de luz ampla, cujas paredes possuem muitas projeções, saliências e reentrâncias, constituídas por células endoteliais, distribuídas em camada única, e por pericitos, dispostos de forma circular e descontínua ao redor das células endoteliais.

As células endoteliais são envoltas por MB, assim como também os pericitos, havendo MB entre célula endotelial e pericito e entre o pericito e células adjacentes. As arteríolas são revestidas por camada de células musculares, também com sua respectiva MB.

Observaram-se algumas hemácias e granulócitos na luz de alguns vasos.

Com relação ao conteúdo celular, observou-se que o núcleo das células endoteliais são alongados, possuem contornos irregulares, contendo

cromatina mais condensada próximo à carioteca, alguns contendo nucléolo evidente.

O citoplasma das células endoteliais é mais abundante na região próxima ao núcleo, contendo organelas como mitocôndrias redondas ou ovais, ribossomos, retículo endoplasmático liso e rugoso, complexo de Golgi, vesículas pinocitóticas e vacúolos de conteúdo eletrôn-transparente ou contendo “figuras de mielina” e corpos densos. Em algumas células, observou-se centríolo.

Afastando-se da região do núcleo, a parede vascular é formada por segmentos mais estreitos de células endoteliais, onde existe menor quantidade de organelas citoplasmáticas.

As células endoteliais são unidas por junções íntimas ou desmossomos, caracterizando os vasos da íris como não fenestrados.

Existem projeções citoplasmáticas das células endoteliais semelhantes a dedos-de-luva em direção à luz vascular. As projeções citoplasmáticas presentes na região de união entre células, são conhecidas por projeções filopoidais. Algumas vezes, estas projeções estiveram unidas umas às outras em suas porções mais extremas, dando a impressão de formações em arco.

Envolvendo as células endoteliais de forma descontínua existem os pericitos que possuem núcleo de formato semelhante ao das células endoteliais, assim como organelas citoplasmáticas semelhantes àquelas.

Nas arteríolas maiores foram observadas as células musculares, contendo miofibrilas e miofilamentos. Os miofilamentos estão dispostos, em geral, próximo a MB. Vesículas pinocitóticas são mais numerosas no citoplasma das células musculares, com localização preferencial próximo à MB.

Os capilares e as vênulas possuem paredes constituídas unicamente por uma camada de células endoteliais e são distingüidos das arteríolas por apresentarem estas últimas, o envoltório de células musculares.

Nas arteríolas maiores, as células musculares são também maiores, além de existir mais de uma camada de células concêntricamente dispostas.

Tanto as células musculares, como os fibroblastos, circundam os vasos, mas não os envolvem totalmente e possuem maior concentração de organelas citoplasmáticas na região próxima ao núcleo.

Ao redor dos vasos existe disposição concêntrica de fibras colágenas e fibroblastos, formando a adventícia vascular, que é mais densa próximo da parede vascular e torna-se mais frouxa mais externamente.

Próximo aos vasos pode-se observar, ainda, feixes nervosos mielinizados e amielínicos.

4.1.1.2. Corpo Ciliar (Figuras 8, 9 e 10).

Os vasos do corpo ciliar correspondem a capilares fenestrados, compostos por várias células endoteliais dispostas em camada única. Em um mesmo capilar, foram observadas fenestrações em algumas regiões, no local de união entre duas células endoteliais e, em outras, desmossomos. Neste ponto onde duas células endoteliais se "tocam", existem projeções digitiformes em direção à luz vascular. Algumas vezes, as projeções digitiformes estiveram “unidas”, formando figuras semelhantes a arcos. O núcleo das células endoteliais é alongado, com condensação da cromatina próxima à carioteca e raramente foi possível encontrar nucléolo. As estruturas citoplasmáticas estão concentradas principalmente na região próxima ao núcleo e se constituem de aparelho de Golgi, retículo endoplasmático liso e rugoso, mitocôndrias e inúmeras vesículas, algumas na face mais próxima da membrana basal, algumas vesículas em pinocitose.

Externamente às células endoteliais, freqüentemente observou-se camada descontínua de pericitos. Em algumas regiões, os pericitos estiveram ausentes. Em outras, havia mais do que uma camada de pericitos envolvendo os vasos. O fator determinante para esta variação aparentemente foi o diâmetro dos vasos, uma vez que vasos menores não possuem envoltório pericítico, e os maiores possuem mais do que uma camada. Também aqui entre os pericitos e as células endoteliais existem a MB da célula endotelial e a do pericito; entre o pericito e o estroma existe a MB do pericito. Os pericitos possuem núcleo e constituintes citoplasmáticos semelhantes aos das células endoteliais.

4.1.1.3. Retina (Figuras 11, 12 e 13).

Os vasos sanguíneos retinianos são capilares do tipo contínuo, estando as células endoteliais unidas umas às outras por meio de junções íntimas. Próximo a esta união, há projeção em forma de “dedo de luva”, em direção à luz vascular. As células endoteliais possuem outras projeções menores, em direção à luz, não associadas à união intercelular.

As células endoteliais possuem núcleo alongado no sentido da luz capilar, cromatina condensada, algumas com figuras de macropinocitose. Os pericitos apresentam citoplasma rico em organelas, eventualmente com fenômeno micropinocitose.

A MB endotelial está aposta às células gliais, não havendo espaços perivasculares, apresentando, em algumas posições, íntima relação com a MB do pericito.

Hemácias, células granulocíticas e plaquetas são observadas em alguns vasos.

4.1.2. GC – M3

4.1.2.1. Íris (Figura 14).

Os vasos irianos de ratos do GCM3 apresentaram a mesma estrutura e organização celular que o observado no GCM2.

Comparando-se animais de GCM2 com os do GCM3 foi possível observar que os do GCM3 aparentemente apresentaram maior número de vesículas citoplasmáticas e de corpos densos nas células endoteliais, nos pericitos, nas células musculares e, também, nos fibroblastos.

As alterações observadas foram mais freqüentes nos pericitos, nas células musculares e nos fibroblastos perivasculares. Nestas últimas células, foi possível observar gotas lipídicas no citoplasma celular.

Principalmente nas arteríolas, observou-se espessamento da MB das células endoteliais e dos pericitos. O espessamento da MB ocorreu de modo não homogêneo.

4.1.2.2. Corpo ciliar (Figura 15).

Avaliando-se comparativamente os animais do GCM2 com os do GCM3, observou-se maior quantidade de corpos densos e “figuras de mielina” nas células endoteliais nos animais pertencentes ao GCM3.

Também nos pericitos, o GCM3 apresentou mais corpos densos e lisossomos, que o GCM2.

A MB dos vasos estava mais espessada em relação aos ratos do GCM2, de maneira não homogênea.

4.1.2.3. Retina (Figura 16).

Comparando-se GCM2 com GCM3, verificamos núcleos com dispersão de cromatina, gotas lipídicas no citoplasma, mitocôndrias edemaciadas, acúmulo de glicogênio, corpos densos e lisossomos, vacúolos contendo “figuras de mielina” e aumento do número de vesículas pinocitóticas. O citoplasma pericítico mostrou-se mais desorganizado que o de células endoteliais, contendo mitocôndrias “gigantes”, muitos corpos densos, vacúolos intracitoplasmáticos e acúmulos de glicogênio. Alguns pericitos com intenso edema citoplasmático e menor número de organelas também foram observados, podendo chegar à desorganização e hialinização citoplasmática completa, ficando o compartimento pericítico preservado, porém totalmente vazio.

4.2. Grupo diabético

4.2.1. GD – M2

4.2.1.1. Íris (Figuras 17 e 18).

Os vasos irianos de ratos do GDM2 apresentaram a mesma estrutura e organização celular que o observado no GCM2.

Foram observadas nos animais deste grupo alterações semelhantes e mais acentuadas que as existentes no GCM3, tais como aumento de corpos densos e vesículas citoplasmáticas nas células endoteliais, pericitos, células

musculares e também nos fibroblastos perivasculares. “Figuras de mielina” e vacúolos eletrón-lucentes também foram vistos nestes animais.

Além disso, as MBs estiveram mais espessadas nos animais deste grupo. O espessamento ocorreu principalmente na parede de arteríolas, quando a MB das células endoteliais, pericitos e também das células musculares foram observadas espessadas, com redução ou ausência do espaçamento entre as mesmas, havendo por vezes sinais de vacuolização da MB.

4.2.1.2. Corpo ciliar (Figuras 19 e 20).

Comparando-se o GDM2 com o GCM2, verificou-se que as células endoteliais dos animais do GD apresentaram quantidade maior de estruturas eletrondensas, vesículas e “figuras de mielina”.

Porém, as alterações mais importantes foram observadas nos pericitos perivasculares, nos quais foram encontrados pericitos totalmente preenchidos por corpos densos.

Houve espessamento das membranas basais do endotélio e também do epitélio pigmentado. Muitas vezes o espaço entre o vaso e o epitélio pigmentado esteve ausente e totalmente preenchido, em decorrência do espessamento das membranas basais. Presença de regiões eletrónttransparentes de tamanhos e formas variadas na região das membranas basais espessadas. Em

alguns locais, as membranas basais, tanto do endotélio vascular, quanto do epitélio pigmentado, estiveram com aspecto semelhante ao GCM3.

As terminações nervosas amielínicas também apresentaram aumento de corpos densos e de “figuras de mielina”, além de diminuição da quantidade de neurotúbulos.

4.2.1.3. Retina (Figura 21).

Os animais diabéticos apresentaram alterações evidentes da MB, com espessamento não homogêneo, mais acentuado na membrana basal externa (MBE) que reveste os pericitos e nos locais próximos à união entre MBE e membrana basal interna (MBI). Os acúmulos osmiofílicos no GD foram observados a partir de M2, sendo mais freqüentes e mais grosseiros que nos animais do GCM3. As projeções da MBE em direção a células vizinhas ocorreram, no GD, já em animais de M2 e foram mais freqüentes que no GC.

No lúmen dos vasos observaram-se hemácias, células granulocíticas e plaquetas.

4.2.2. GD – M3

4.2.2.1. Íris (Figura 22 e 23).

Os vasos irianos de ratos do GDM3 apresentaram a mesma estrutura e organização celular que a observada no GCM2.

As alterações observadas nos animais de GDM3 foram semelhantes às observadas no GDM2, porém, com maior intensidade. Assim também nestes animais foi observado acúmulo de vesículas e de corpos densos, “figuras de mielina” e vacúolos eletrôn-lucentes, ocorrendo nas células endoteliais, nos pericitos, nas células musculares e nos fibroblastos perivascularares.

Muitas vezes, os pericitos apresentaram o compartimento celular preservado, porém com as organelas totalmente alteradas, reconhecendo-se as “figuras de mielina” e os corpos densos. Algumas células musculares e alguns fibroblastos perivascularares também foram visibilizados como contendo organelas totalmente desestruturadas.

As alterações mais importantes ocorreram nas arteríolas, assim como o foi observado no GDM2.

Principalmente nas arteríolas, mas ocorrendo também nos capilares, foi possível observar espessamento da MB das células endoteliais. O espessamento não foi homogêneo, por vezes, o espaço entre a célula endotelial e a muscular esteve “preenchido” pela MB espessa. Observou-se também, vacuolização ou cavitação da MB, principalmente nos lugares onde a mesma encontrava-se mais espessada.

4.2.2.2. Corpo ciliar (Figuras 24).

Comparando-se o GD no M2 e no M3, observou-se que os animais do GDM3 apresentaram maior quantidade de corpos densos, vesículas citoplasmáticas e vacúolos de conteúdo eletrtransparente, ou contendo “figuras de mielina”, além de mitocôndrias edemaciadas, tanto em células endoteliais como nos pericitos. Observou-se, ainda, rarefação citoplasmática também nas células endoteliais e nos pericitos.

Os fibroblastos, assim como os feixes nervosos perivasculares, também apresentaram aumento dos corpos densos.

A MB do epitélio pigmentar mostrou-se mais espessada que a MB dos vasos, com as mesmas características que foram observadas no GDM2.

4.2.2.3. Retina (Figura 25 e 26).

Os espaços eletrtransparentes, observados apenas raramente no GCM3, foram observados mais freqüentemente no GD, principalmente no GDM3.

Na região perivascular foram evidentes as alterações em prolongamentos citoplasmáticos de células adjacentes, tais como, edema, acúmulo de corpos residuais, lisossomos, granulações eletrondensas e glicogênio, principalmente em animais de M3.

Em M3, observou-se alguns vasos totalmente preenchidos por debris celulares.

5. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA ESPESSURA DA MEMBRANA BASAL

Verificando os resultados obtidos na análise estatística, foi possível observar:

- 1) Na íris houve efeito significativo de grupos, ou seja, a espessura da MB foi maior no grupo de ratos diabéticos (Tabelas 7a, 7b e 7c).
- 2) No corpo ciliar ocorreu efeito da interação, tendo se observado que no grupo normal a espessura da MB aumentou com a idade, enquanto no diabético não, uma vez que já em M2 a MB já se encontrava espessada (Tabelas 8a, 8b e 8c).
- 3) Na retina não foi detectada diferença estatística entre os grupos ou entre momentos, ou seja, a espessura da MB não se alterou em decorrência da idade em ambos ou da presença ou não do diabetes. (Tabelas 9a, 9b e 9c).

Tabela 7a - Média do quadrado mínimo comparativa entre grupos, com os respectivos erros-padrão para as medidas da espessura da membrana basal de vasos da íris de ratos diabéticos e normais, em mm.

Grupo	Espessura Média	Erro-Padrão	Pr > t
Diabético	3.36	0.34	<.0001 *
Normal	1.28	0.23	0.0004

Tabela 7b - Média do quadrado mínimo comparativa entre momentos, com os respectivos erros-padrão para as medidas da espessura da membrana basal de vasos da íris de ratos diabéticos e normais, em mm.

Tempo	Espessura Média	Erro-Padrão	Pr > t
M2	2.22	0.27	<.0001
M3	2.42	0.31	<.0001

Tabela 7c - Média do quadrado mínimo comparativa entre grupos e momentos, com os respectivos erros-padrão para as medidas da espessura da membrana basal de vasos da íris de ratos diabéticos e normais, em mm.

Grupo	Tempo	Espessura Média	Erro-Padrão	Pr > t
Diabético	M2	3.14	0.44	<.0001
Diabético	M3	3.58	0.53	<.0001
Normal	M2	1.30	0.33	0.0032
Normal	M3	1.26	0.33	0.0043

Tabela 8a - Média do quadrado mínimo comparativa entre grupos, com os respectivos erros-padrão para as medidas da espessura da membrana basal de vasos do corpo ciliar de ratos diabéticos e normais, em mm.

Grupo	Espessura Média	Erro-Padrão	Pr > t
Diabético	2.50	0.26	<.0001
Normal	2.02	0.27	<.0001

Tabela 8b - Média do quadrado mínimo comparativa entre momentos, com os respectivos erros-padrão para as medidas da espessura da membrana basal de vasos do corpo ciliar de ratos diabéticos e normais, em mm.

Tempo	Espessura Média	Erro-Padrão	Pr > t
M2	2.07	0.27	<.0001
M3	2.45	0.26	<.0001

Tabela 8c - Média do quadrado mínimo comparativa entre grupos e momentos, com os respectivos erros-padrão para as medidas da espessura da membrana basal de vasos do corpo ciliar de ratos diabéticos e normais, em mm.

Grupo	Tempo	Espessura Média	Erro-Padrão	Pr > t
Diabético	M2	2.82	0.38	<.0001
Diabético	M3	2.18	0.34	<.0001
Normal	M2	1.31	0.39	0.0057
Normal	M3	2.73	0.38	<.0001 *

Tabela 9a - Média do quadrado mínimo comparativa entre grupos, com os respectivos erros-padrão para as medidas da espessura da membrana basal de vasos da retina de ratos diabéticos e normais, em mm.

Grupo	Espessura Média	Erro-Padrão	Pr > t
Diabético	2.94	0.27	<.0001
Normal	2.92	0.24	<.0001

Tabela 9b - Média do quadrado mínimo comparativa entre momentos, com os respectivos erros-padrão para as medidas da espessura da membrana basal de vasos da retina de ratos diabéticos e normais, em mm.

Tempo	Espessura Média	Erro-Padrão	Pr > t
M2	2.81	0.24	<.0001
M3	3.06	0.27	<.0001

Tabela 9c - Média do quadrado mínimo comparativa entre grupos e momentos, com os respectivos erros-padrão para as medidas da espessura da membrana basal de vasos da retina de ratos diabéticos e normais, em mm.

Grupo	Tempo	Espessura Média	Erro-Padrão	Pr > t
Diabético	M2	3.02	0.35	<.0001
Diabético	M3	2.86	0.42	<.0001
Normal	M2	2.60	0.34	<.0001
Normal	M3	3.25	0.34	<.0001

FIGURAS

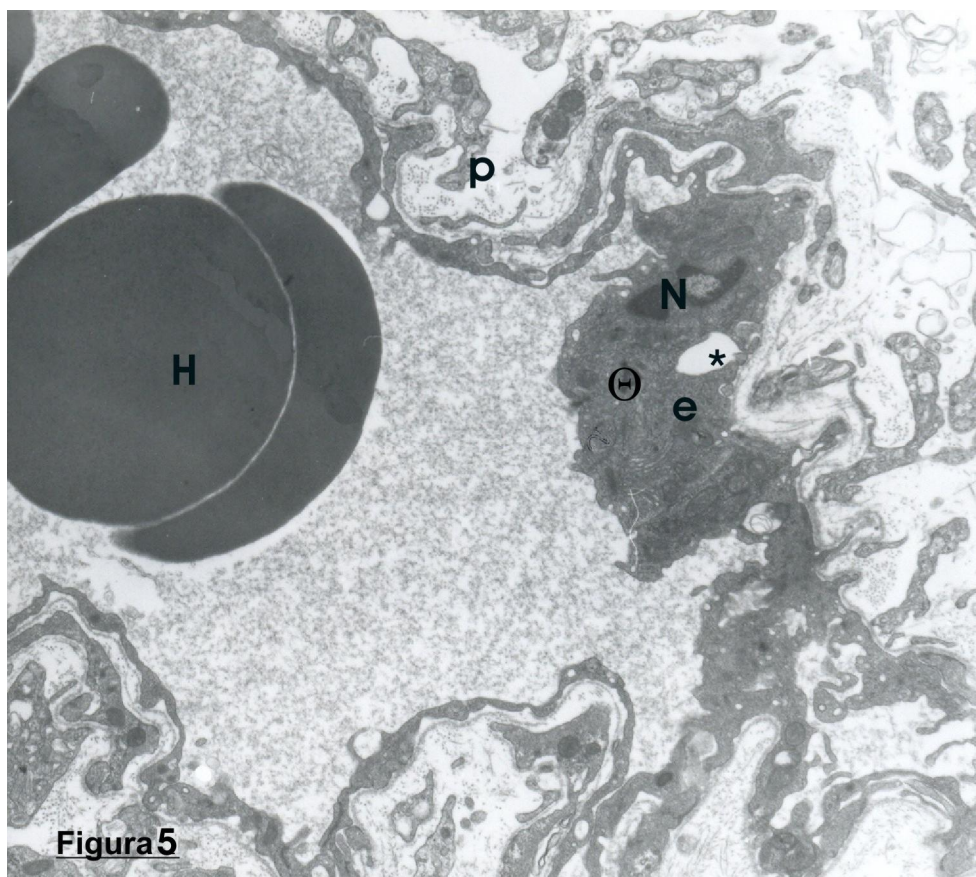


Figura 5: Vaso da íris de rato normal em M2. Célula endotelial (e) com núcleo alongado (N) e citoplasma contendo mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, vesículas pinocitóticas e vacúolos eletron-transparentes (*) e corpos densos (Θ). Pericitos (p) dispostos de forma circular e descontínua ao redor das células endoteliais. Projeções citoplasmáticas das células endoteliais em formações em arco em direção à luz vascular. Hemácea (H) na luz vascular (ME-2900X5).

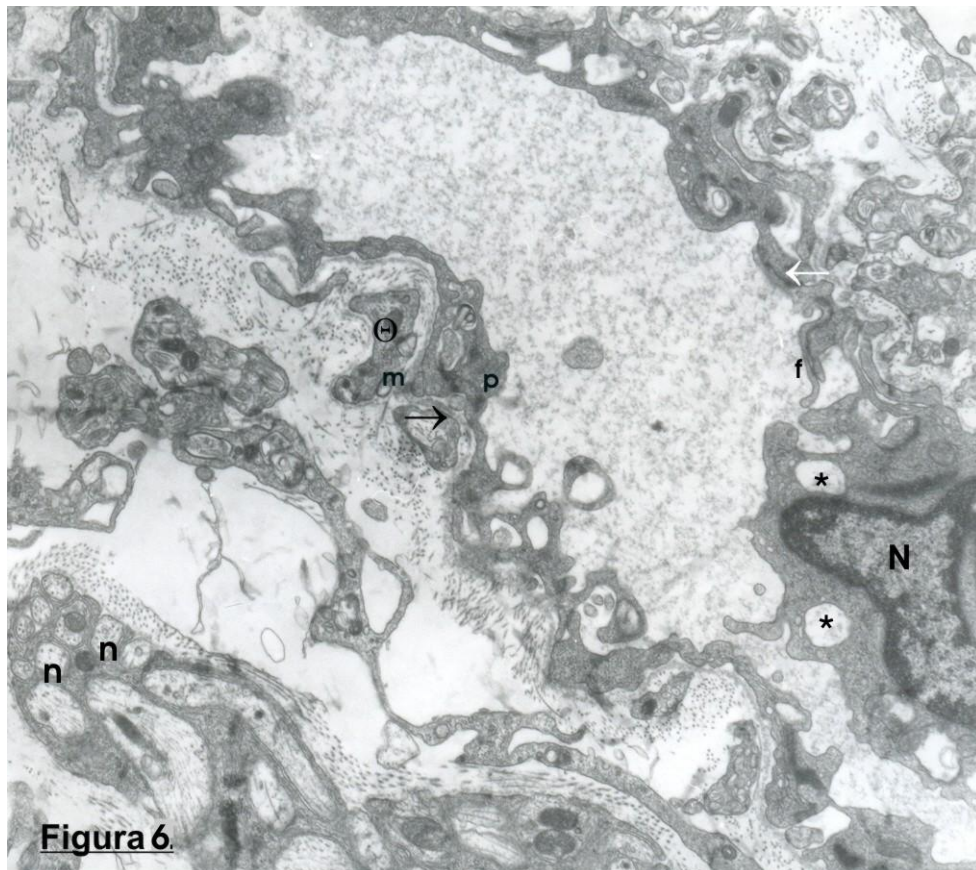


Figura 6: Vaso da íris de rato normal em M2. Membrana basal (→) ao redor de células endoteliais. União entre células endoteliais (→ branca). Projeção filopoidal (f). Núcleo (N). Pericito (p) contendo mitocôndrias (m), corpo denso (Θ) e vacúolos de conteúdo eletrôn-transparentes (*). Feixe nervoso amielínico (n) (ME-2900X5).

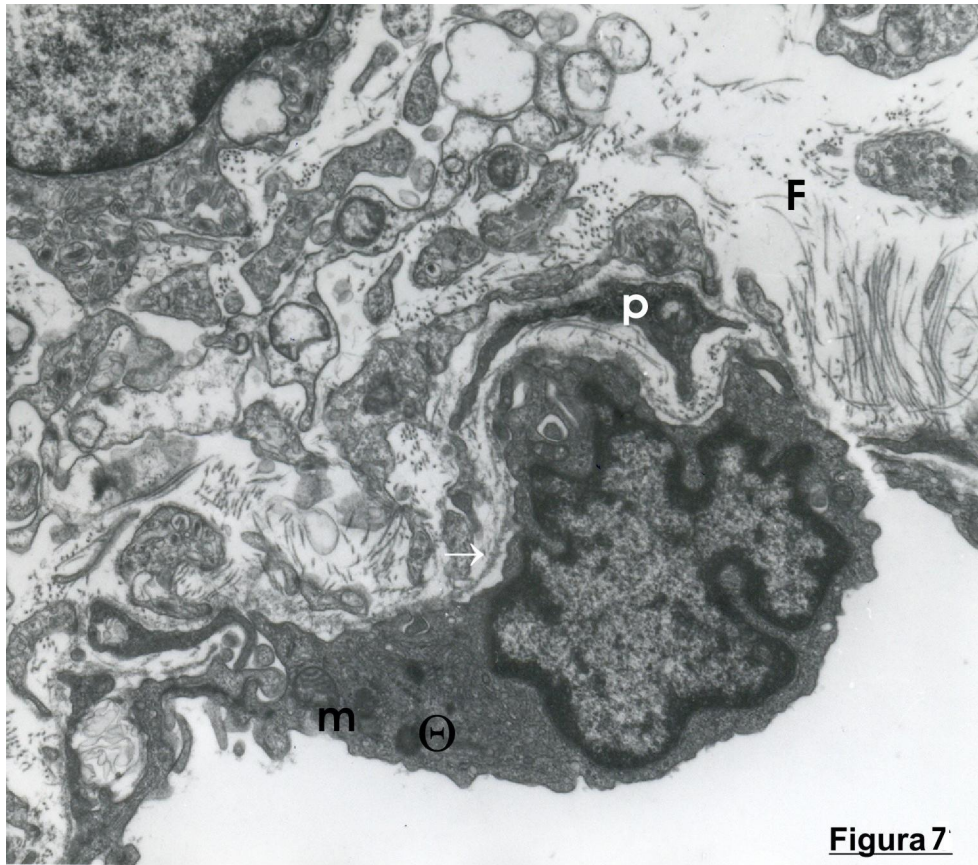


Figura 7: Vaso da íris de rato normal em M2. Os componentes citoplasmáticos das células endoteliais são mais presentes na região próxima ao núcleo. Mitocôndria (m). Corpo denso (Θ). Membrana basal (→) externamente à parede vascular. Pericito (p). Fibras colágenas longitudinais ou transversais e fibroblastos no estroma (F). (ME-2900X5).

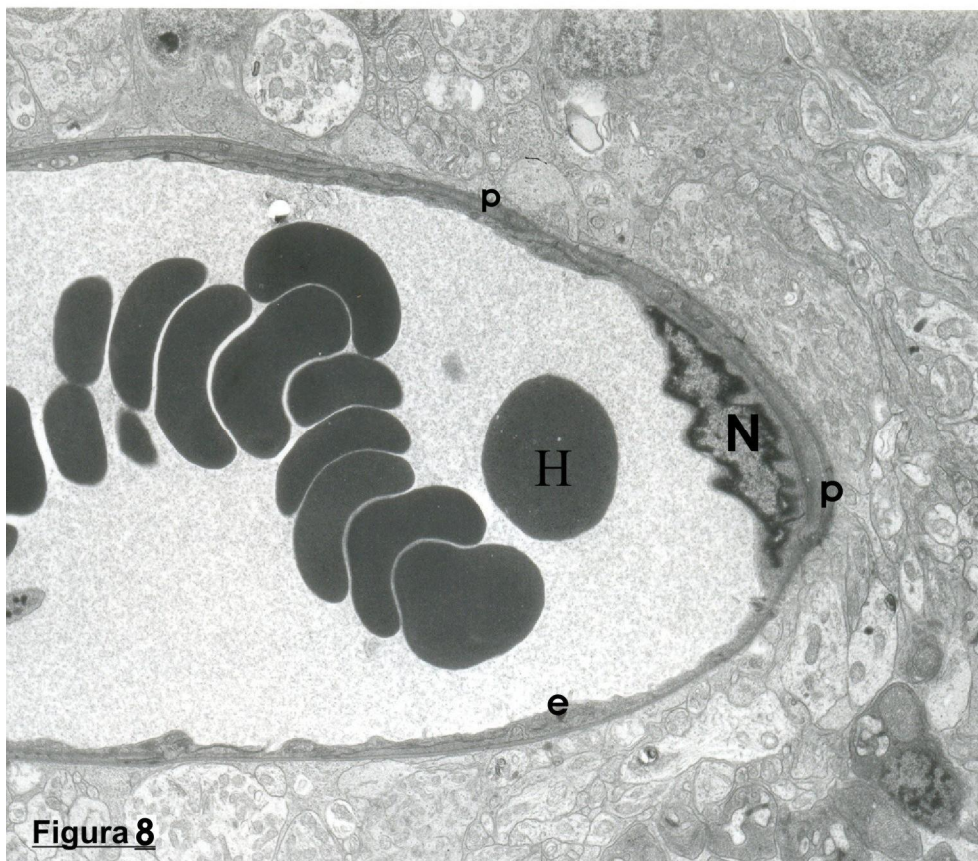


Figura 8: Vaso do corpo ciliar de rato normal em M2. Capilar com camada única de células endoteliais (e). Núcleo (N) com cromatina condensada perto da carioteca. Pericitos (p). Hemácea (H) (ME-4200X5).

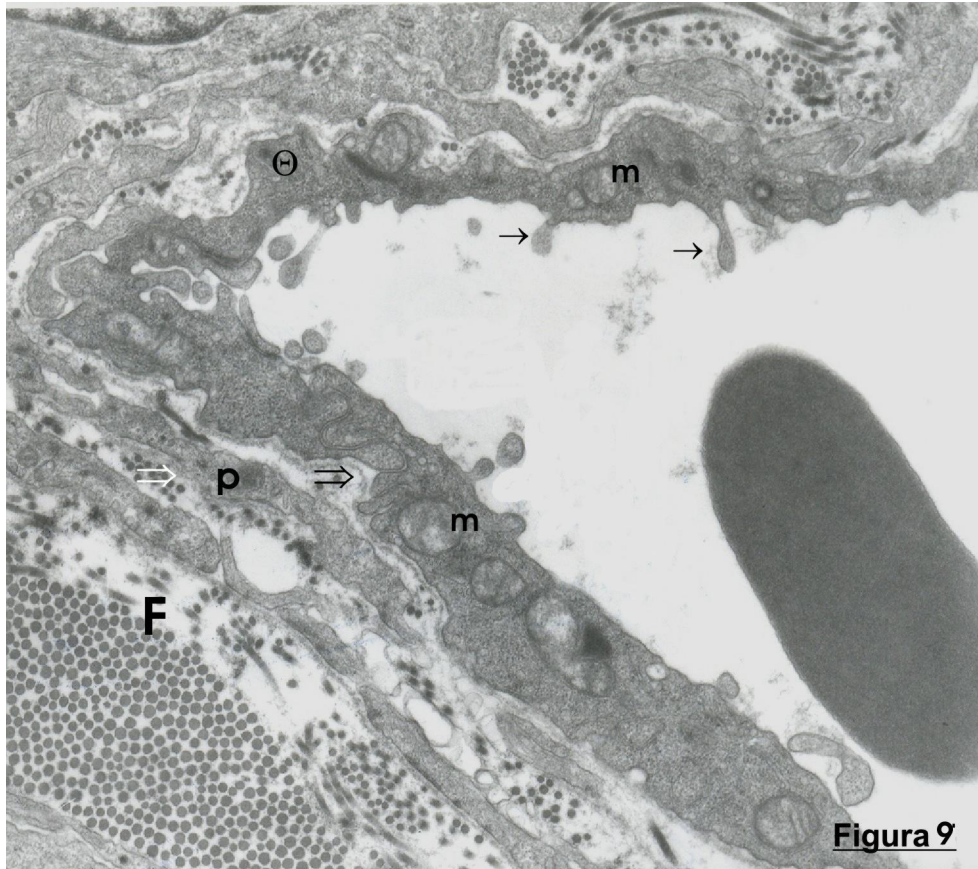


Figura 9: Vaso do corpo ciliar de rato normal em M2. Observar organelas nas células endoteliais, como retículo endoplasmático, mitocôndrias(m), complexo de Golgi e poucos corpos densos (Θ). Projeções digitiformes em direção à luz vascular (→).Membrana Basal (⇒). Pericito (p) e respectiva membrana basal (⇒ branca). Fibroblastos (F) (ME-4200X5).

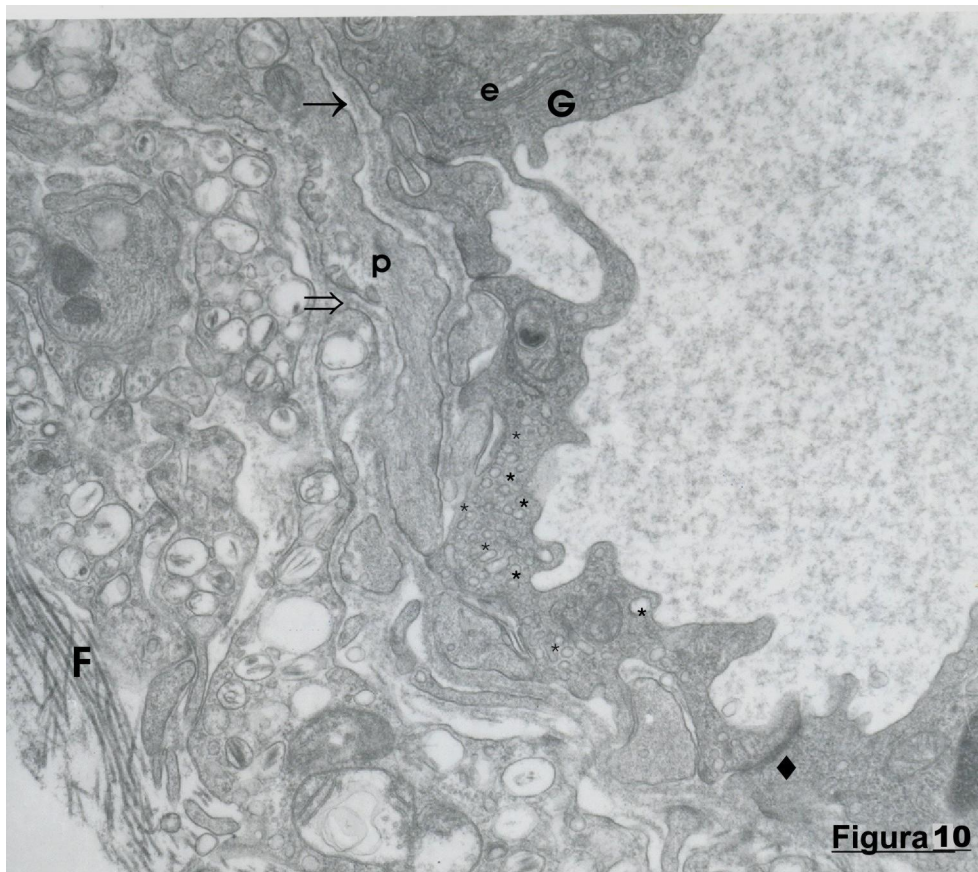


Figura 10: Vaso do corpo ciliar de rato normal em M2. Células endoteliais com inúmeras vesículas citoplasmáticas (*). Golgi (G). Observar detalhe da membrana basal (→) da célula endotelial (e) e membrana basal (⇒) do pericito (p). Fibroblasto (F). União entre células endoteliais(◆)(ME-4200X5).

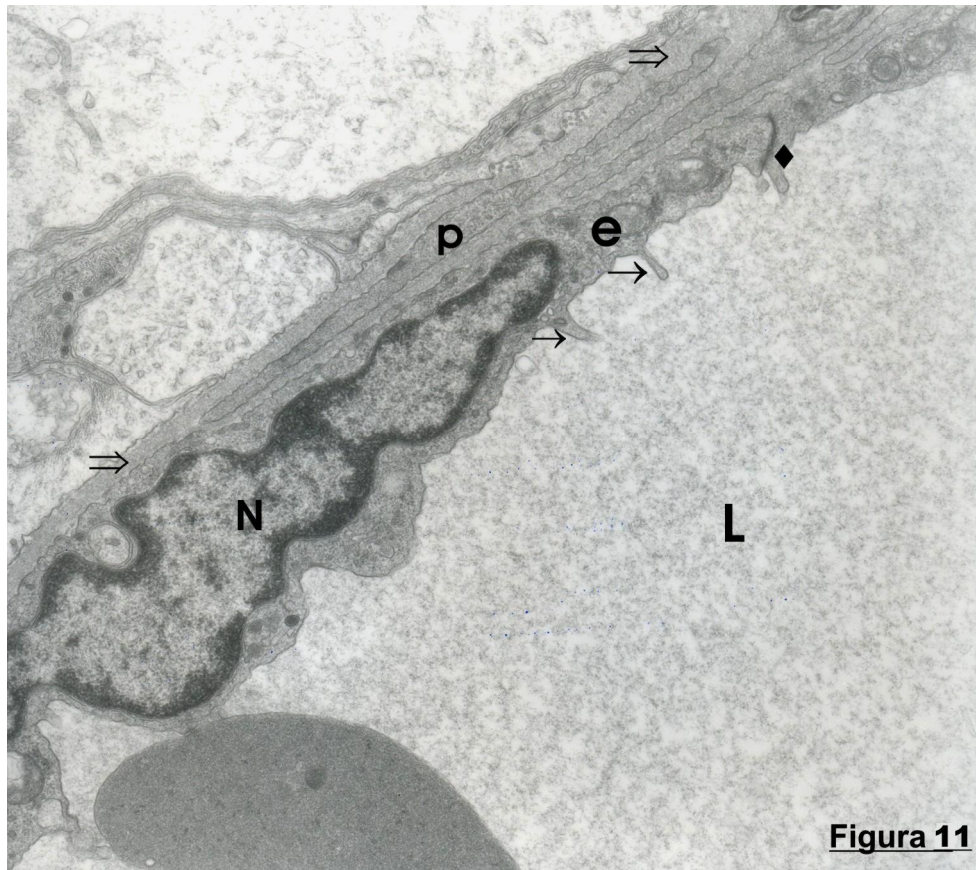


Figura 11: Vaso retiniano de rato normal em M2. Células endoteliais (e) unidas por junções íntimas (♦), contendo núcleo (N) alongado e com cromatina próxima a carioteca. Pericito (p). Membrana basal (⇒). Projeções endoteliais (→) em direção a luz vascular (L) (ME-3400X5).



Figura 12: Vaso retiniano de rato normal em M2. Células endoteliais (e) envoltas por pericitos (p). Observar membrana basal da célula endotelial em intima relação com a membrana basal do pericito (→)(ME-3400X5).



Figura 13 Vaso retiniano de rato normal em M2. Detalhe do núcleo (N) de pericito e citoplasma rico em retículo endoplasmático liso e rugoso. Figuras de macropinocitose em célula endotelial (→) e micropinocitose em célula pericítica (⇐) (ME-3400X5).

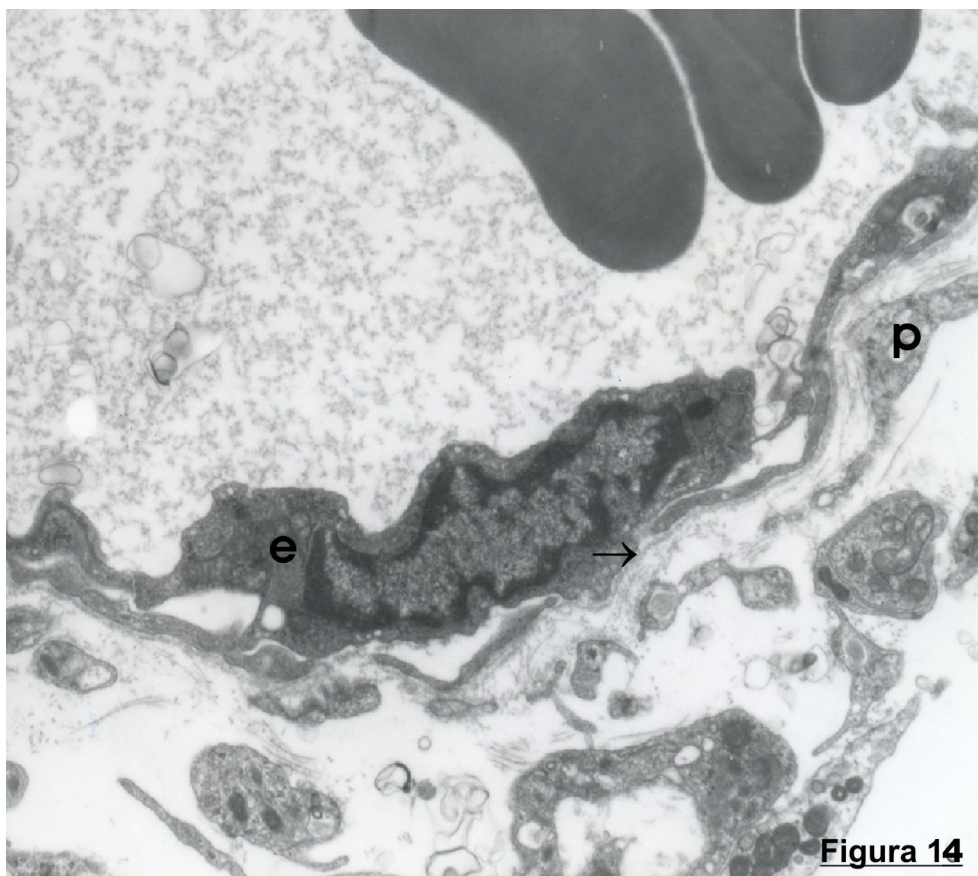


Figura 14: Vaso da íris de rato normal em M3. A estrutura dos vasos irianos de ratos de M3 é a mesma que dos de M2. Célula endotelial (e), pericito (p),membrana basal (→) (ME-2900X5).



Figura 15: Vaso do corpo ciliar de rato normal em M3. Observar maior número de vesículas citoplasmáticas nos pericitos (*). Membrana basal (→) mais espessa que em GCM2 (ME-4200X5).

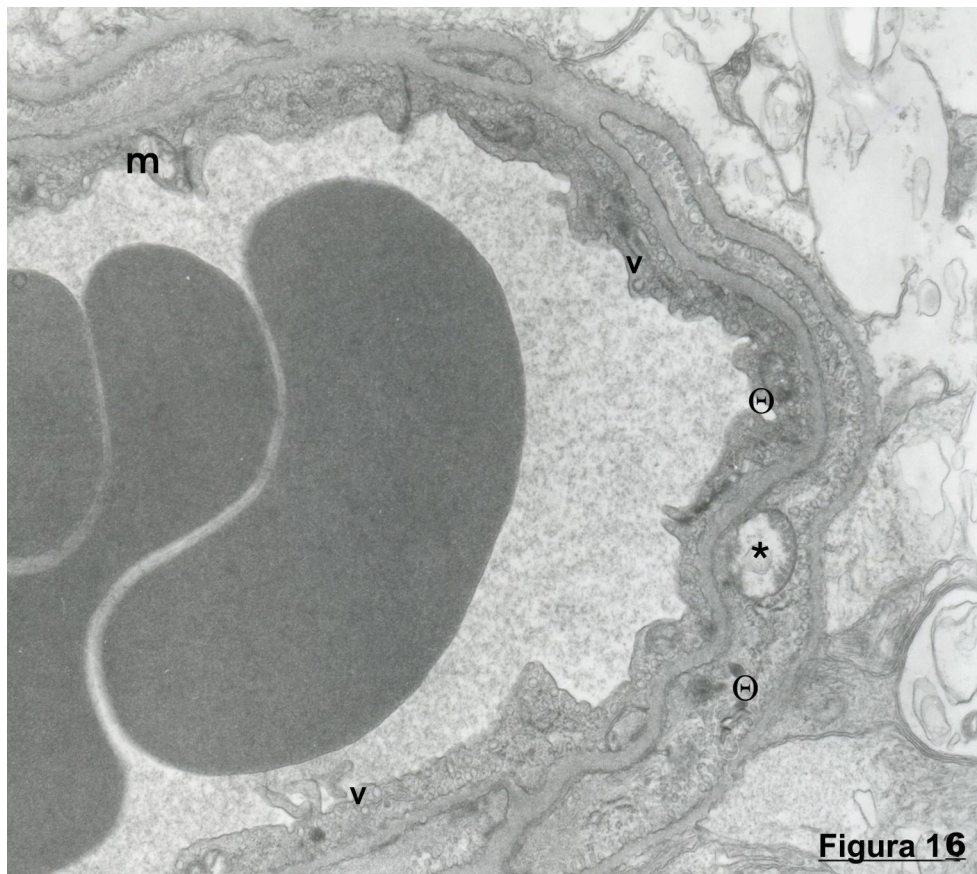


Figura 16: Vaso da retina de rato normal em M3. Células endoteliais com mitocôndrias (m) edemaciadas, corpos densos (Θ) e aumento do número de vesículas pinocitóticas (v). As alterações são mais evidentes nos pericitos que apresentam desorganização de organelas, aumento de vesículas citoplasmáticas e de vacúolos (*) . A membrana basal parece espessada(ME-3400X5).



Figura 17

Figura 17: Vaso da íris de rato diabético em M2. Aspecto semelhante de vaso da íris de rato normal. Projeções filopoidais (f). Macropinocitose (*) (ME-2900X5).

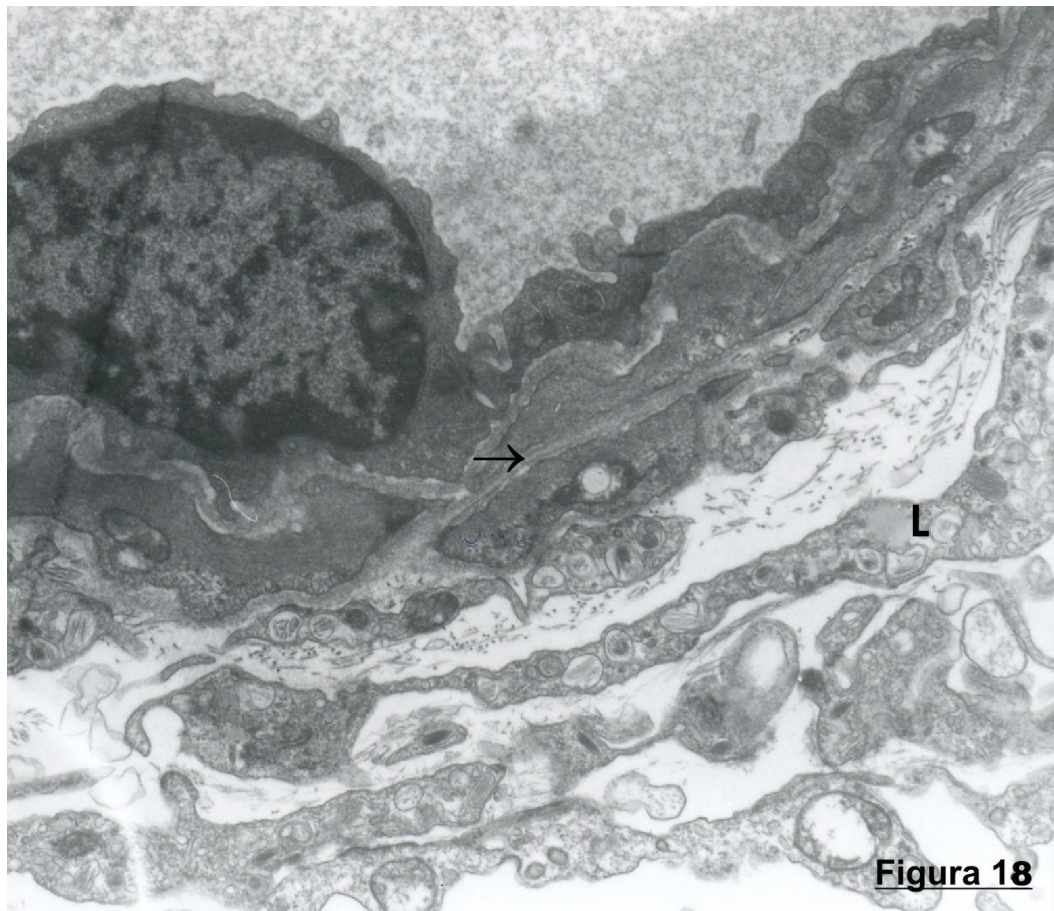


Figura 18: Vaso da íris de rato diabético em M2. Observar aumento de corpos densos e vesículas citoplasmáticas no citoplasma de células endoteliais, pericitos e nos fibroblastos. Membrana basal mais espessa e com sinais de vacuolização (→). Gota lipídica (L) (ME-2900X5).

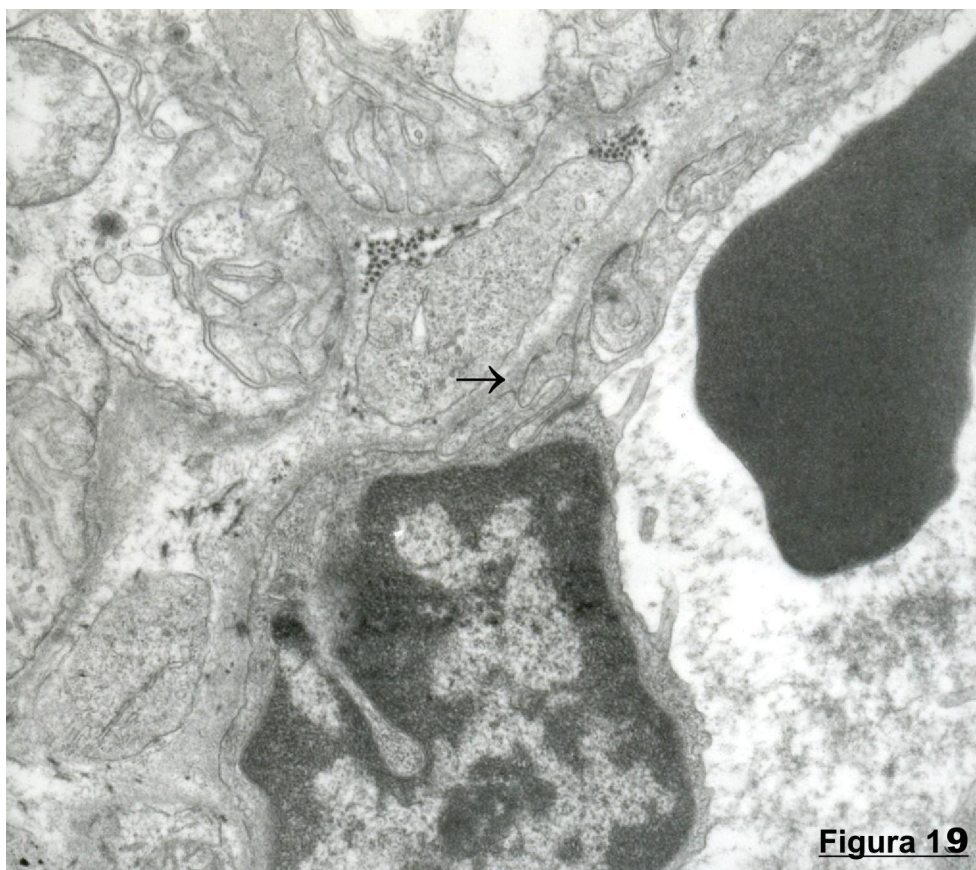


Figura 19: Vaso do corpo ciliar de rato diabético em M2. Detalhe mostrando espessamento da membrana basal (→) (ME-4200X5).

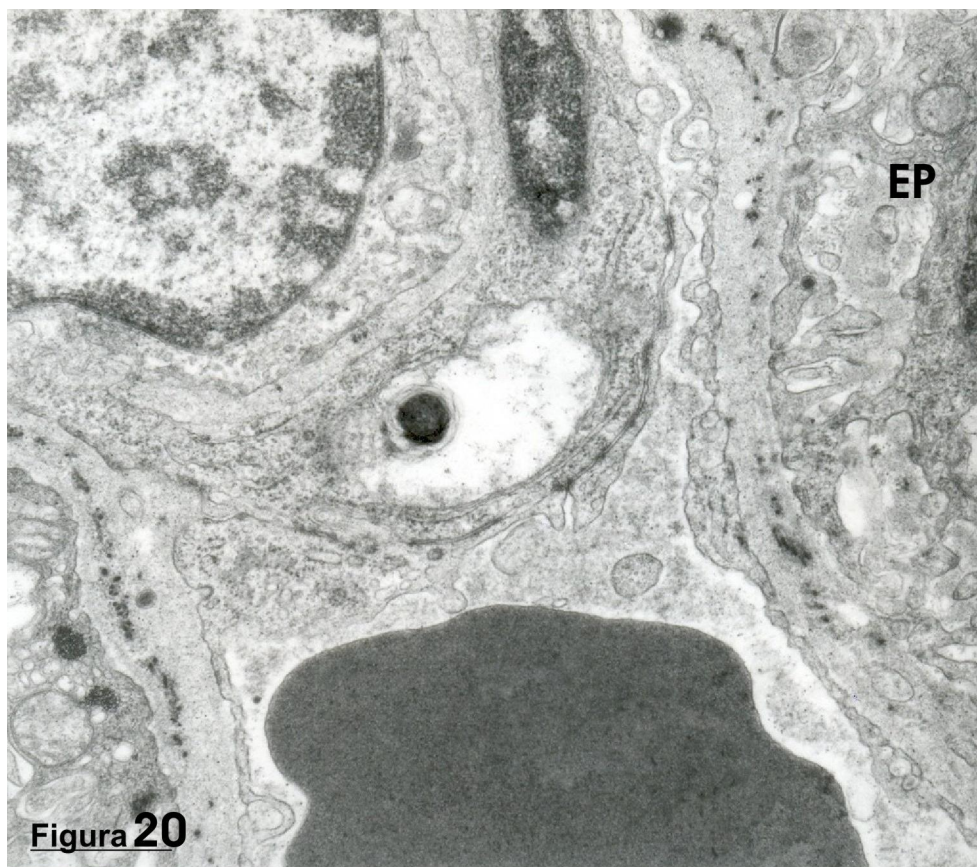


Figura 20: Vaso do corpo ciliar de rato diabético em M2. Observar que o espessamento da membrana basal é não homogêneo. Epitélio pigmentado (EP) (ME-4200X5).



Figura 21: Vaso retiniano de rato diabético em M2. Membrana basal com espessamento não homogêneo. Depósito osmifílico (→ (ME-3400X5).

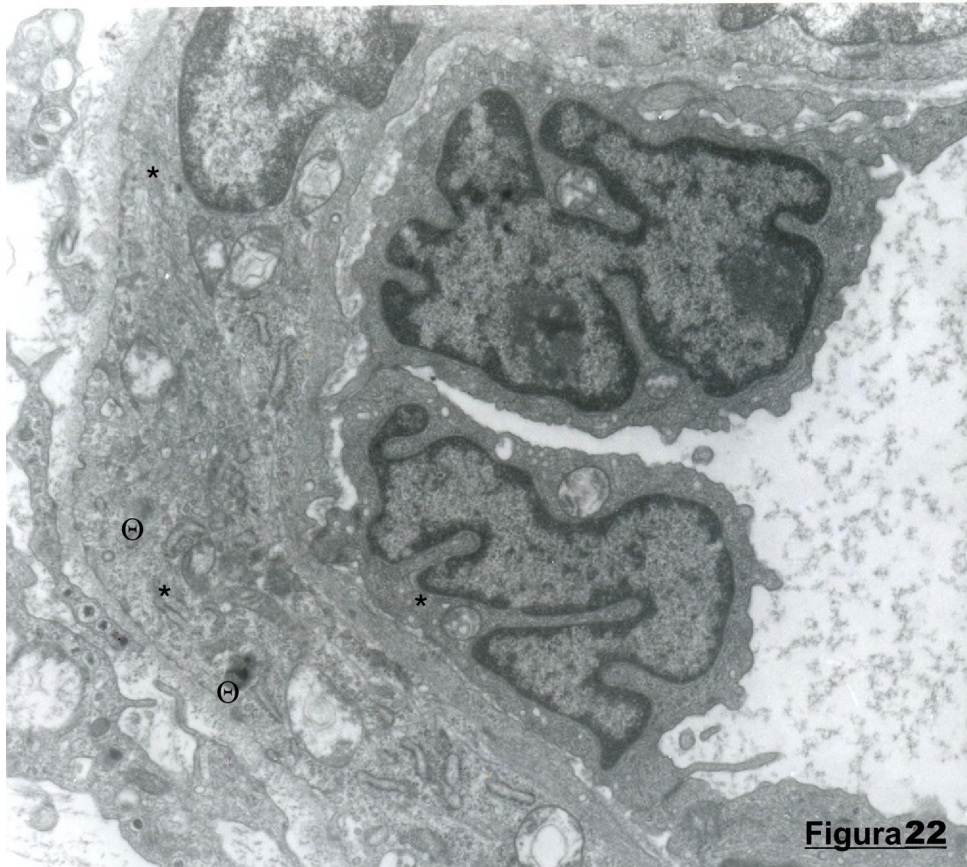


Figura 22: Vaso da íris de rato diabético em M3. Acúmulo de vesículas (*) e corpos densos (Θ) nas células endoteliais, pericitos e fibroblastos (ME-2900X5).

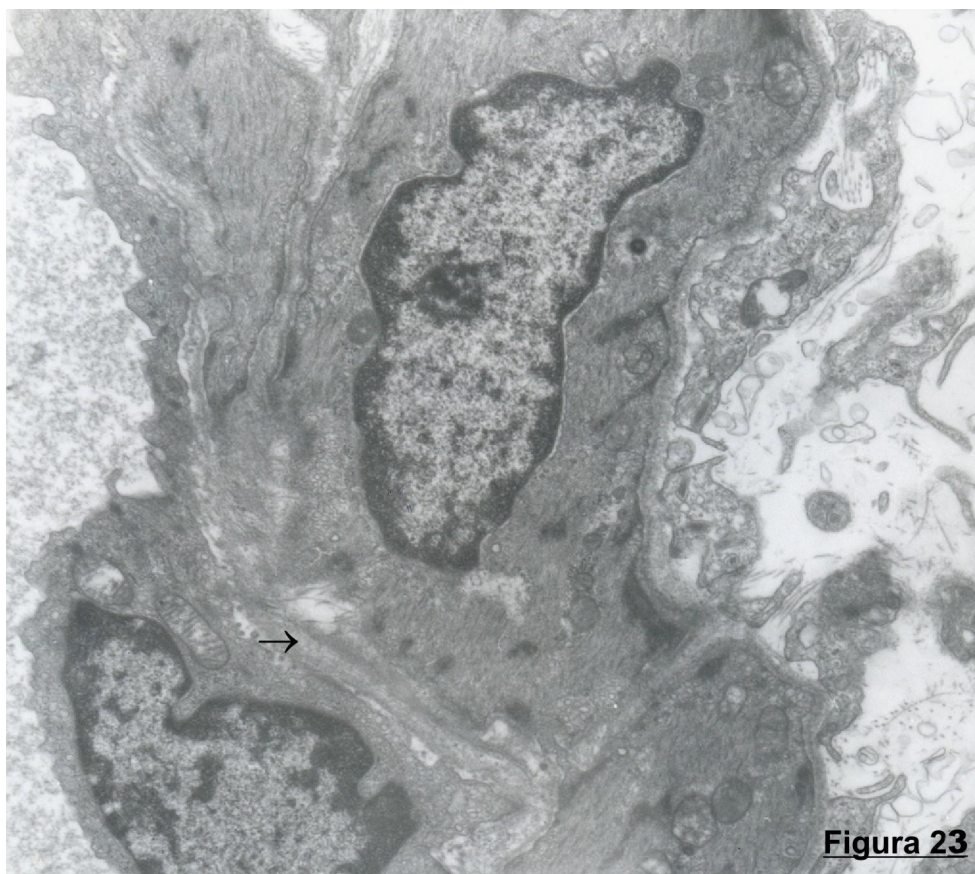


Figura 23: Vaso da íris de rato diabético em M3. Células musculares com organelas desestruturadas. Espessamento da MB (→) por vezes preenchendo o espaço entre célula endotelial e célula muscular (ME-2900X5).

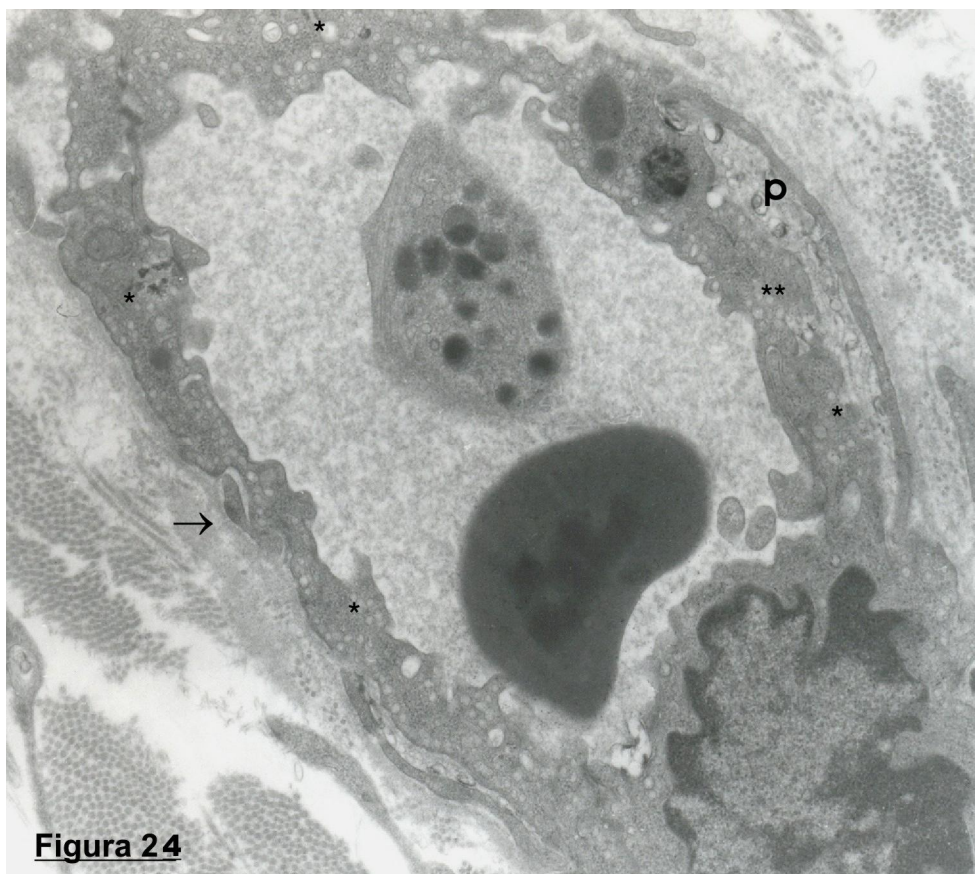


Figura 24: Vaso do corpo ciliar de rato diabético em M3. Célula endotelial contendo grande quantidade de vesículas (*). Pericito (p) com organelas desestruturadas. Membrana basal (→) (ME-4200X5).

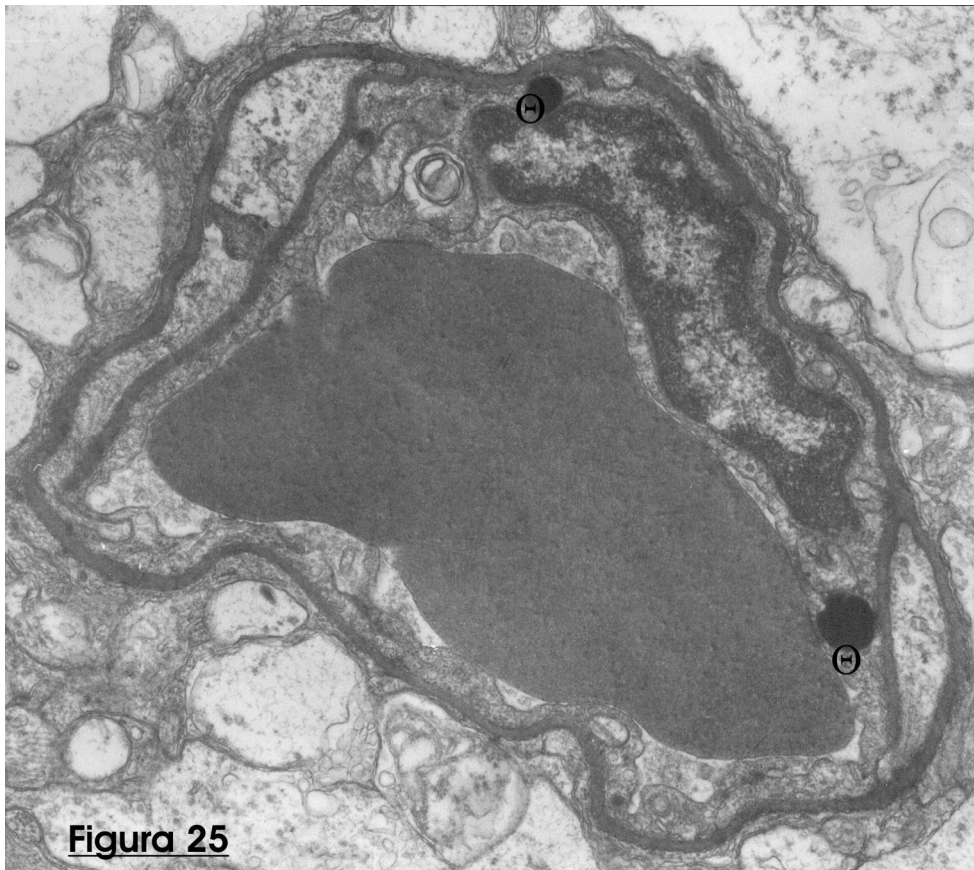


Figura 25: Vaso retiniano de rato diabético em M3. Os pericitos apresentaram alterações mais evidentes que as células endoteliais, com rarefação citoplasmática. Corps densos (Θ) (ME-3400X5).

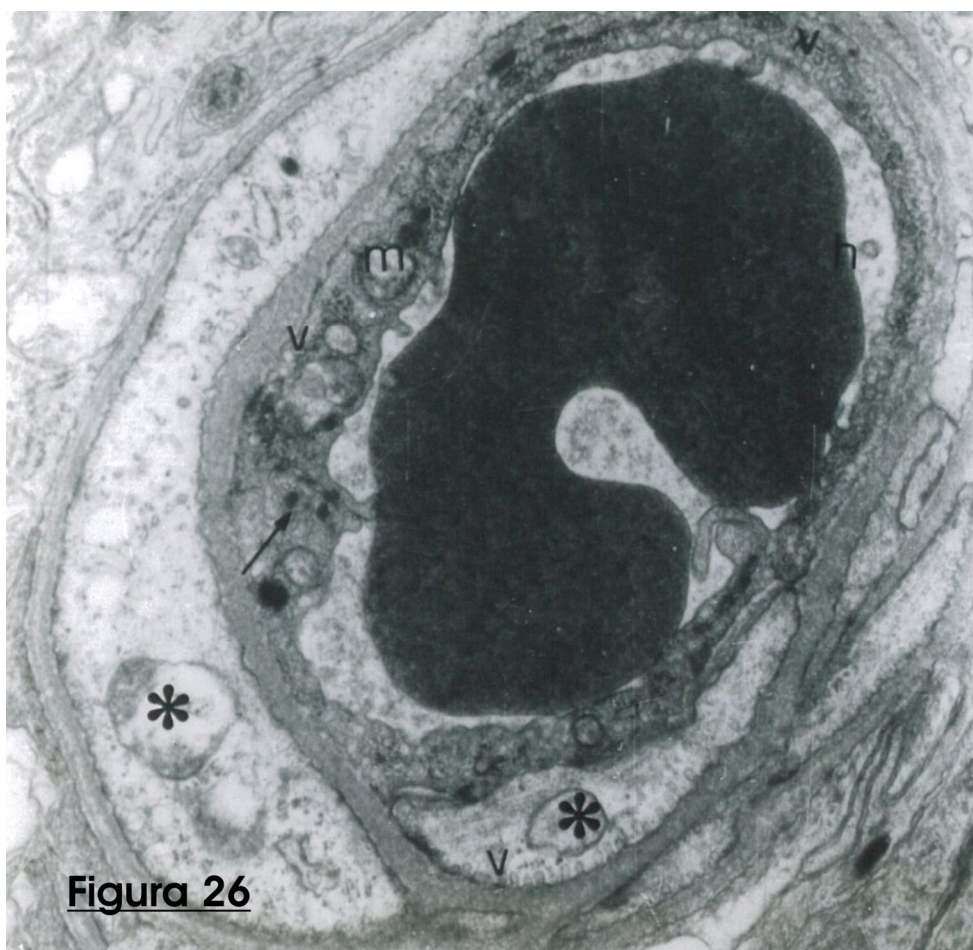


Figura 26

Figura 26: Vaso retiniano de rato diabético em M3. As células endoteliais possuem aumento de corpos densos (seta) e de vesículas (v). Mitocôndria (m). É notável a alteração citoplasmática que ocorre nos pericitos, onde não é possível identificar organelas citoplasmáticas, exceto pela presença de vacúolos (*) e vesículas. Membrana Basal espessa (ME-3400X5).

DISCUSSÃO

1- Modelo experimental e análises clínicas e bioquímicas.

Os modelos experimentais ajudam no entendimento fisiopatogênico de doenças, sendo muito úteis para o estudo do diabetes. Alguns animais desenvolvem alterações que não são idênticas às que ocorrem no homem, como os ratos (64, 83, 110, 111), ou desenvolvem lesões morfológicamente idênticas, como os cães (83, 112). Entretanto, nestes últimos, o tempo de evolução das alterações é muito longo, o que dificulta a sua utilização, acrescendo-se o fato de que estes animais atualmente estão com uso em experimentação extremamente questionáveis.

Tendo em vista a dificuldade de manuseio e os custos de uma pesquisa muito prolongada, além de fatores como: fácil manuseio (alimentação, higiene e acomodação); ciclo biológico curto, o que permite obtenção de alterações crônicas e degenerativas em pouco tempo; utilização de pouco espaço, possibilitando o trabalho simultâneo com vários grupos experimentais; desenvolvimento de alterações retinianas do diabetes com pouco tempo de indução, os ratos têm sido largamente utilizados como modelos para diabetes experimental e muitos estudos utilizam o rato como animal de experimentação para avaliação de alterações decorrentes do diabetes.

Acresce-se a estes fatores, o fato de Arthur Roquete de Macedo ter desenvolvido na Faculdade de Medicina de Botucatu, o diabetes experimental em rato Wistar, de forma semelhante à Orloff (1975)(113), incentivando o desenvolvimento de projetos de pesquisa nesta linha. Desde 1986, foi formado um grupo de estudos nesta Instituição, para estudo dos efeitos do diabetes sobre o organismo como um todo, grupo ativo até a data atual, já tendo sido publicados inúmeros trabalhos utilizando o mesmo modelo experimental, o que determinou um bom domínio das técnicas (64, 114-119), sendo totalmente padronizado o modo de indução, assim como os cuidados a serem tomados para que a pesquisa seja válida.

Utiliza-se, neste modelo, a Aloxana, um derivado do ácido úrico que destrói as células beta do pâncreas, provocando diabetes do tipo 1, insulino dependente, de longa duração em muitas espécies de animais (120). Apesar de críticas quanto ao uso desta droga, a grande experiência do grupo, além do menor custo em relação aos outros métodos, como a Estreptozotocina (121), fizeram com que não fossem efetuadas alterações no modelo original. Acresce-se a este facilitador, o fato de que a Aloxana é ainda bastante utilizada em estudos experimentais na área oftalmológica e não oftalmológica até os dias atuais (122-124).

Tendo por base os estudos já concluídos, foram seguidos os mesmos passos quanto às diversas variáveis no uso da Aloxana: dose a ser utilizada, modo de emprego, necessidade de jejum antes da sua aplicação, via a

ser utilizada para a injeção, sistema idealizado para a aplicação, além do acompanhamento dos animais durante o estudo (114-119).

Estes estudos mostraram, também, que existe a necessidade de controles clínicos e bioquímicos para o acompanhamento dos animais, uma vez que, após a injeção da droga, são várias as possibilidades: o não desenvolvimento do diabetes, a morte por doença extremamente grave e o desenvolvimento da doença diabética por certo período, principalmente períodos próximos à indução, com a posterior regressão espontânea do estado diabético (118). Assim, os parâmetros do seguimento são extremamente importantes para assegurar que realmente os animais estudados são portadores de diabetes e que a doença persiste grave ao longo de todo o período experimental (114-119).

O óbito ocorre por descompensações importantes do metabolismo, tendo sido verificada uma taxa de 38,9% até o 14º dia após a indução do diabetes segundo Spadella (118), que observou óbito em 38,9% dos animais até o 14º dia após a indução da doença.

Pela possibilidade de óbito dos animais após a indução da doença e também pela possibilidade de reversão do estado diabético ao longo do tempo, é conduta do grupo de estudo do diabetes experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu, realizar a indução da doença em número sempre superior ao que se pretende estudar, visando à reposição dos animais. Com isto, evita-se o risco de uma amostra não representativa, optando-se por ter os grupos com o mesmo

número de participantes até o final do experimento, realizando a reposição dos animais que, por qualquer motivo, não satisfaçam os parâmetros necessários.

A expectativa de vida do rato hígido é de 3 anos. Quando eles se tornam diabéticos, torna-se difícil mantê-los vivos por mais que um ano e meio (112). Neste modelo, os animais iniciam com 3 meses de vida, devido à necessidade de se ter animais pós-desmame e também porque ratos com menos do que 200 a 300 gramas de peso corporal são muito sensíveis à injeção da Aloxana e a taxa de óbito poderia ser mais elevada.

Pelo nosso protocolo, os animais são observados em três momentos, dentro de um período de 12 meses e 15 dias. A primeira observação (M1) foi 15 dias após a indução do diabetes pela Aloxana, período necessário para confirmação da instalação do quadro de diabetes grave (64, 118).

A segunda observação foi em M2, quando 5 animais dos grupos GC e GD foram sacrificados, 1 mês após a instalação do quadro de diabetes grave, com o intuito de analisar as alterações iniciais do diabetes nos vasos. Este período está baseado em Caldwell et al. (125), que encontraram alterações em olhos de ratos diabéticos três semanas após a indução do diabetes experimental.

A terceira observação ocorreu em M3, onde os animais dos GC e GD foram sacrificados após 12 meses de M1, tempo este suficiente para produzir alterações crônicas significativas secundárias ao diabetes induzido experimentalmente (64, 126).

O aspecto geral dos animais diabéticos foi bastante diferente dos animais do grupo controle, com piora no decorrer do acompanhamento, sendo estes aspectos clínicos observados, compatíveis com diabetes grave (64, 118).

Quanto ao peso dos animais do grupo controle, observou-se que não houve variações durante o período de acompanhamento, o que era esperado, uma vez que os animais estavam saudáveis. Já, os animais diabéticos, apresentaram médias de peso inferiores ao grupo de animais normais nos dois momentos estudados. Entretanto, em M2, apresentaram-se com peso acentuadamente reduzido, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Este fato é similar à evolução clínica em humanos e também a dados da literatura que mostram perda aguda e acentuada de peso no início do desenvolvimento do diabetes (127). Em M3, não foram encontradas diferenças significativas entre as médias de peso dos dois grupos. Neste momento os animais, apesar do catabolismo acentuado próprio do diabetes, poderiam estar em fase de melhor equilíbrio metabólico que na fase aguda, pelo próprio tempo de evolução da doença (113, 118, 119, 128-133).

Os animais dos grupos-controle mantiveram valores de glicemia compatíveis com dados da literatura sobre animais normais da mesma espécie (113, 116, 129, 134, 135). Nos animais dos grupos diabéticos, tanto a glicemia, quanto a glicose urinária estiveram acima dos valores observados nos animais do grupo controle, nos três momentos de observação, o que foi importante, juntamente com as manifestações clínicas, para caracterizar o quadro diabético

desencadeado e mantido ao longo do experimento (8, 136). Os valores de glicemia nos animais diabéticos, estiveram acentuadamente elevados no início do experimento, lembrando que as flutuações glicêmicas podem ocorrer por vários fatores, ligados a estresse, ingestão alimentar, entre outros. A glicosúria, que também ocorre com frequência no diabetes (8, 127), ocorreu de forma ainda mais acentuada, pois a Aloxana é, por si só, nefrotóxica. (87).

2- Avaliação ultra-estrutural

Os vasos da íris, corpo ciliar e retina dos ratos, nos grupos estudados, apresentaram distribuição das camadas celulares e organelas semelhantes às descritas para os olhos humanos (137).

Tanto a estrutura dos vasos, formados por camada única de células endoteliais, revestidos por pericitos e adventícia perivascular, como as organelas citoplasmáticas contidas nas células endoteliais e pericíticas, foram similares nos vasos da íris, corpo ciliar e retina. Esta observação foi válida para os animais normais e diabéticos, nos dois momentos experimentais.

As células endoteliais dos vasos dos ratos mostraram características semelhantes na íris, no corpo ciliar e na retina, assim como observado também em células endoteliais de outras localizações do olho (64, 93, 138).

Entretanto, algumas pequenas características diferenciam os vasos destas três regiões de estudo. As diferenças, sem dúvida, estão relacionadas com a função das estruturas. Assim, a íris, por ser o “diafragma” do olho, precisa ser formada por tecido que possa ser sujeito a grande movimentação, ou que permita alterações da forma, fato que ocasiona a grande quantidade de saliências e reentrâncias observadas na parede dos vasos, comparativamente com os vasos retinianos e do corpo ciliar (93, 137). Devido à movimentação grande dos tecidos irianos, o estroma é frouxo, com a adventícia vascular também acompanhando este padrão. Por outro lado, os vasos retinianos possuem como característica não terem espaços na região perivascular, estando sempre envoltos por células retinianas.

A característica mais marcante que diferencia os vasos das três regiões seria a união entre as células endoteliais. Foram observados, na íris, vasos não fenestrados, assim como os vasos da retina. Ao contrário do que ocorre na coróide (138) e no corpo ciliar (93), onde os vasos não possuem uniões selantes entre as células endoteliais. Estes detalhes estabelecem que haja profundas diferenças na função e atividade dos vasos destas regiões estudadas, ou seja, onde existem junções selantes, as trocas devem ocorrer por transporte transcitoplasmático. Ao passo que nos que possuem junções não selantes, a passagem pode se dar através dos espaços existentes na parede vascular, mecanismo que existe no corpo ciliar e que está envolvido na produção do humor aquoso (139).

Interessante observar as projeções citoplasmáticas em direção à luz vascular, já descritas anteriormente (92), presentes não só na íris, mas também na coróide e na retina. Uma das possíveis origens para estas projeções seriam pregas digitiformes unidas por seus ápices e que podem dar origem à macropinocitose (92, 93).

De modo geral todos os vasos estudados são ricos em organelas citoplasmáticas, motivo do intenso gasto de energia que ocorre nos tecidos oculares.

Desta forma, alguma doença que interfira no metabolismo, como o diabetes, pode levar a profundas alterações na parede vascular.

Assim, já é conhecido que, com efeito, as alterações do diabetes ocorrem em toda a microvasculatura ocular (140). Nos vasos não fenestrados, como os da íris e retina, a ruptura das junções celulares, gera complicações do diabetes, como o edema macular retiniano (141-143).

Observou-se neste estudo, como já foi descrito anteriormente no diabetes, algumas alterações comuns aos três grupos de vasos, como: aumento na vacuolização citoplasmática, alterações degenerativas do pericito, espessamento da membrana basal, degeneração de organelas, com desestruturação completa nos casos mais avançados (144).

As vesículas citoplasmáticas são relacionadas ao transporte de substâncias seguindo a via transcitoplasmática. O aumento do número de vesículas implica em maior utilização deste meio de transporte nos vasos de animais do GN em M3 e nos animais do grupo diabético, principalmente nos animais do GDM3. Estas alterações se repetiram nos três grupos vasculares. Portanto, a variação da quantidade de vesículas pode estar relacionada tanto ao processo de senilidade, quanto às alterações degenerativas decorrentes da doença diabética. Já haviam sido observadas na íris e no corpo ciliar, alterações nas vesículas (90, 92, 93), similares às observadas neste estudo.

Também foi verificado nos animais do GNM3 e nos animais do GD, estruturas elétron-densas em maior quantidade. Foi aqui utilizada esta denominação de estrutura elétron-densa para estruturas que poderiam corresponder a lisossomos ou corpos densos e foi preferida esta nomenclatura, uma vez que não se fez a identificação dos vacúolos digestivos.

As chamadas “figuras de mielina” se referiram aos detritos celulares que estão dentro do citoplasma celular e que, provavelmente, são originários de morte de organelas que estão em degradação. Os vacúolos identificados muitas vezes estiveram, também, opticamente vazios.

Todos estes eventos podem representar morte de organelas, que estão sendo removidas do citoplasma. Este aumento de corpos densos foi caracteristicamente observado em animais idosos (M3) e diabéticos, tendo sido

descrito anteriormente nas células irianas (50, 90), nas células endoteliais da retina (64), da coróide (138) e do corpo ciliar (93) de ratos diabéticos aloxânicos.

Todas as alterações citoplasmáticas observadas nas células endoteliais, ocorreram também nos pericitos, com intensidade mais acentuada nestes últimos, em todos os grupos de vasos e nos dois momentos de observação. Os pericitos são estruturas cuja função provável está relacionada ao controle do fluxo sanguíneo, possuindo função de suporte, auxiliando na contração da parede vascular e com participação na fagocitose (145-147).

Anteriormente já foram verificadas acentuadas alterações em pericitos retinianos de ratos diabéticos, quando os mesmos mantiveram apenas o seu envoltório e tiveram as organelas todas destruídas, tendo sido chamados de “pericitos fantasmas” (64, 148, 149). Alterações similares também já foram descritas em pericitos do corpo ciliar que, apresentaram-se mais alterados do que o próprio endotélio vascular (93) e igualmente nos vasos irianos (90).

Portanto, foi possível observar que os pericitos estão sujeitos a profundas alterações em decorrência do estado diabético e que estas alterações ocorrem tanto nos vasos irianos, como no corpo ciliar e na retina, fazendo supor que os vasos diabéticos tenham perda do seu tônus, produzindo lentidão de escoamento vascular, assim como fraqueza na parede dos vasos. Estas alterações morfológicas levam a suposição de alterações hemodinâmicas.

A literatura suporta esta idéia. Acredita-se que a origem das alterações vasculares diabéticas esteja relacionada a fatores metabólicos e hemodinâmicos, que interagem e estimulam fatores de crescimento e citocinas. Fatores de crescimento endotelial, como o fator R-2, são responsáveis pelo acúmulo de matriz extracelular que ocorre nos vasos. Há perda da elasticidade vascular, espessamento da parede e redução acentuada do fluxo sanguíneo. Cita-se que rigoroso controle metabólico protegeria parcialmente contra este dano vascular (150, 151).

Ressalta-se a não observância de microaneurismas na parede vascular de ratos diabéticos em nenhum dos três sítios de estudo, ou seja, não foram observados microaneurismas em vasos da íris, corpo ciliar e retina.

Os microaneurismas estão presentes e são achados constante na retinopatia diabética em humanos (152, 153). Os vasos da coróide também desenvolvem microaneurismas em humanos (154). Entretanto, os vasos da íris e corpo ciliar não figuram entre os possíveis sítios de desenvolvimento desta afecção.

Já, nos olhos de roedores diabéticos, os microaneurismas não foram anteriormente descritos (64).

O maior achado anatômico no diabetes de longa evolução é o espessamento da íntima das arteríolas menores, primariamente por acúmulo de colágeno do tipo IV (relacionado com a membrana basal), o que compromete o

fluxo sanguíneo periférico. Este fenômeno ocorre unânime e precocemente no DM, e é muito reproduzido em estudos experimentais (150, 151).

Desta forma, a maioria dos estudos morfológicos que versam sobre diabetes, estão relacionados com o espessamento da MB que parece preceder outras alterações, inclusive as perdas de pericitos (83).

Mesmo quando se avalia lesões que ocorrem precocemente em decorrência do estado diabético, o espessamento da MB é tido como evidente (78, 155, 156).

O modelo experimental utilizado no presente estudo também reproduziu o espessamento da membrana basal vascular, observado tanto ao redor das células endoteliais, como dos pericitos.

A causa do espessamento da MB ainda não é totalmente conhecida. Entretanto, sabe-se que o espessamento provoca alteração da função celular e/ou da difusão de oxigênio e reduz o contato entre os pericitos e a célula endotelial, contribuindo para as alterações vasculares dos diabéticos (151).

O acúmulo de detritos celulares por lesão diabética, poderia ser um dos fatores de origem deste espessamento e já foram verificados acúmulos de material PAS positivo nas paredes vasculares, com espessamento progressivo da MB (50). E também neste sentido, o presente estudo pode dar uma contribuição para o esclarecimento do espessamento da MB, quando foi possível observar nos

ratos diabéticos mais velhos a presença de material osmiofílico na MB que poderia ser resultado de depósitos de detritos.

Outros estudos sugerem que fatores metabólicos podem originar o espessamento da MB, sendo utilizados medicamentos que, de acordo com os resultados observados, são capazes de reduzir seu surgimento nos animais diabéticos, em vasos renais, com uso de uma droga inibidora do receptor da Angiotensina II, o Losartan (157). Estudos na aorta, com o uso de perindopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina, mostraram redução nos níveis de endotelina 1 plasmática, e efeito protetor sobre a célula endotelial em animais diabéticos (158). Ou seja, já são conhecidos alguns medicamentos que podem prevenir o espessamento da MB em grandes vasos. Pelas diferenças enormes que existem entre pequenos e grandes vasos, haveria necessidade de se desenvolver estudos experimentais para avaliação destas drogas sobre os capilares oculares.

Interessante o encontro de vacuolização da MB nos vasos dos animais do presente estudo. Ou seja, além do espessamento da MB, espessamento da MB, alterações outras como algumas áreas de vacuolização, foram observadas a partir do GC em M3. Este encontro, pela análise qualitativa realizada, foi mais acentuado nos animais do GD em M2 e GD em M3. A explicação para este fato poderia ser que o diabetes está mais relacionado a este fenômeno. Outra hipótese seria que alterações involutivas poderiam ser agravadas e ocorrerem mais precocemente no diabetes (50). A ligação da

vacuolização da MB com a senilidade já foi apontada por outros autores em humanos (137) e também em ratos diabéticos (64).

Outra importante observação foi o fato do espessamento da MB ter sido não homogêneo, nos três grupos de vasos e nos dois momentos de avaliação e a este fato voltaremos mais adiante.

A avaliação morfométrica da MB, mostrou que houve aumento significativo da espessura da MB apenas nos vasos irianos, não ocorrendo o mesmo nos vasos do corpo ciliar e da retina, apesar dos valores médios observados terem sido sempre maiores nos animais mais velhos e diabéticos.

A não homogeneidade do espessamento da MB pode ser um dos fatores que interferiram no resultado de não significância. Tal fato já impossibilitou outros autores de efetuarem a morfometria por outros métodos, tanto nos vasos irianos, como nos do corpo ciliar (90, 93).

Avaliações quantitativas já haviam sido efetuadas em vasos retinianos, mostrando que o espessamento ocorre em ratos diabéticos (64).

Yanof(78) também relatou o espessamento difuso em olhos humanos cegos, provenientes de indivíduos diabéticos, ocorrendo também em idosos não diabéticos, de maneira não homogênea, fragmentada e irregular.

Desta forma, há evidências de que o espessamento da MB seja freqüente em olhos diabéticos. Porém, ocorre de maneira não homogênea. Devido ao fato

da heterogeneidade de ocorrência, a análise morfométrica poderia ter gerado dados de não significância estatística.

Outro fator poderia ser relacionado à metodologia aqui empregada. O método do AutoCad nos pareceu bastante adequado, permitindo estabelecer medidas não tendenciosas, com avaliação aleatória de vasos. Entretanto, devido à necessidade de se ter como os locais de avaliação o cruzamento completo das linhas do quadriculado com a MB, o número de observações variou de um animal para outro, dependendo do formato, tamanho e local de corte de cada vaso avaliado. Ou seja, podem haver quantidades maiores ou menores de medidas de determinado animal cujos valores interfiram na média. Como não foi o objetivo do presente estudo verificar a variação entre os ratos, todas as medidas foram analisadas conjuntamente, sendo interessante em estudos futuros, uma melhor apuração nestes valores, eventualmente rato a rato.

Interessante notar que nos vasos irianos houve espessamento da MB com significância estatística. Porém, nos vasos do corpo ciliar e retina não. Este achado é de difícil explicação. Na realidade, a avaliação mais trabalhosa foi justamente a feita nos vasos da íris, pela existência de tantas Saliências e reentrâncias que existe na parede dos vasos desta região. A primeira hipótese poderia ser que há maior chance de erro neste tipo de avaliação, o que não se confirma pela observação dos desvios-padrão, que foram semelhantes em todos os grupos, denotando que as medidas foram homogêneas.

As análises morfométricas devem sempre ser buscadas. Poderiam ser realizadas também para outros eventos que ocorreram aqui neste estudo, como para avaliação da quantidade de vesículas citoplasmáticas ou de corpos densos. Entretanto, quando se trata de microscopia eletrônica, são estudos extremamente complexos. Ainda, mesmo que efetuados com rigor científico podem não trazer a realidade do que se passa no nível celular, uma vez que as alterações bioquímicas antecedem em muito as alterações morfológicas.

Assim, valorizando as observações ultra-estruturais, pode-se inferir que alterações vasculares relacionadas com a doença diabética são importantes. Ocorrem nos vasos da íris, do corpo ciliar e da retina. Afetam as células endoteliais e pericíticas, levando ao aumento de vesículas, corpos densos e ao espessamento não homogêneo da MB.

Novos estudos devem ser providenciados procurando outros meios de quantificar os achados.

CONCLUSÕES

Frente às condições experimentais empregadas e aos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Ø Os animais diabéticos diferiram dos animais normais quanto à avaliação ultra-estrutural dos vasos da íris, corpo ciliar e retina, demonstrando que o estado diabético provoca alterações vasculares nestas localizações.
- Ø Há evidentes alterações ultra-estruturais na membrana basal de células endoteliais e pericíticas nos três tipos de vasos estudados. O espessamento da membrana basal é mais evidente em animais diabéticos, apesar da avaliação morfométrica comprovar este achado apenas nos vasos irianos.
- Ø Os vasos dos animais normais de 12 meses diferiram dos de um mês, podendo-se sugerir que as alterações observadas sejam decorrentes de processo involutivo.

REFERÊNCIAS

1. Waife So. Definition and Diagnosis of Diabetes. In: ____ Diabetes Mellitus 7 ed. 1967;1:1 -11.
2. Bennett Ph. Definition, Diagnosis, and Classification of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance. In: KAHN, CR, WEIR, GC (Eds) Joslin's diabetes mellitus. 1994;13.ed:193-200.
3. Alberti Kg, Zimmet Pz. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, Provisional Report of a Who Consultation. Diabet Med. 1998;15:539-53.
4. Craitoiu S, Mocanu C, Olaru C, Rodica M. Retinal Vascular Lesions in Diabetic Retinopathy. Oftalmologia. 2005;49(1):82-7.
5. Felig P, Bergman M. The Endocrine Pancreas: Diabetes Mellitus. In: FELIG, P, BAXTER, JD, FROHMAN, LA (Eds) Endocrinology and metabolism. 1995:1107-250.
6. Nelson Lb, Martyn Lj. In Metabolic Diseases Affecting the Eye. In: TASMAN, W, JAEGER, EA (Eds) Duane's foundations of clinical ophthalmology. 1998;54.
7. Foster Dw. Diabetes Melito. 14 ed. FAUCI AS, BRAUNWALD, E., ISSELBACHER, K.J., editor. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill Interamericana do Brasil; 1998.
8. Sherwin Rs. Diabetes Mellitus. GOLDMAN L, BENNETT, J.C., editor.; 2000.
9. Pietryga M, Biczysko W, Wender-Ozegowska E, Brazert J, Bieganska E, Biczysko R. [Ultrastructural Examination of the Placenta in Pregnancy Complicated by Diabetes Mellitus]. Ginekol Pol. 2004 Feb;75(2):111-8.
10. Satoh I, Saito M, Kinoshita Y, Shomori K, Suzuki H, Yamada M, et al. Effects of Cyclohexenonic Long-Chain Fatty Alcohol on Diabetic Rat Trachea. Life Sci. 2005 Sep 2;77(16):2030-9.
11. Saudek Cd. Diabetes Mellitus. HARVEY AM, JOHNS, R.J., CKUSICK, V.A., OWENS, A.H., ROSS, R.S., editor.: Norwalk: Appleton & Lange; 1988.
12. Panzram G. Mortality and Survival in Type 2 (Non-Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus. Diabetologia. 1987;30:123-31.
13. King H, Rewers Mm. Who Ad Hoc Diabetes Reporting Group Global Estimates for Prevalence of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance in Adults. Diabetes Care. 1993;16:157-77.
14. Suetsugu M, Takebayashi K, Aso Y. Association between Diabetic Microangiopathy and Vascular Endothelial Function Evaluated by Flow-Mediated Vasodilatation in Patients with Type 2 Diabetes. Int J Clin Pract. 2007 Jun;61(6):920-6.
15. Leys Am. The Eye and Renal Diseases. 1998 [updated 1998; cited v.5 chapter 31]; Available from.
16. Hogan Mj, Feeney L. The Ultrastructure of the Retinal Vessels-Vascular Glial Relationships. J Ultrastruct Res. 1963;9:47-64.
17. Olefsky J. Diabete Melito. In: WINGARDEN & SMITH Cecil: tratado de medicina interna. 1990;231:1198-216.
18. Grey Rh, Malcolm N, O'reilly D, Morris A. Ophthalmic Survey of a Diabetic Clinic. I: Ocular Findings. Br J Ophthalmol. 1986;70:797-803.

19. Aiello Lm, Cavallerano Jd. Ocular Complications of Diabetes Mellitus. In: KAHN, CR, WEIR, GC (Eds) Joslin's diabetes mellitus 13ed Philadelphia: Lea & Febiger. 1994:771-93.
20. Duke-Elder S. Diabetic Retinopathy. In: Duke-Elder S System of Ophthalmology. 1967:410-48.
21. Hirata Ce, Fang T, Casella Amb, Et Al. Prevalência De Retinopatia Em Uma População De Diabéticos. Arq Bras Oftalmol. 1986;49:31-3.
22. Vilela M, Saadi A, Pletsch L, Giacomet A. Inquérito Entre Pacientes E Médicos Sobre as Estratégias Aplicadas Na Prevenção E Tratamento Da Retinopatia Diabética. Arq Bras Oftalmol. 1997;60:152-5.
23. Nehemy M. Retinopatia Diabética. Arq Bras Oftalmol. 1998;61:366-70.
24. Caird Fi, Pirie A, Ramsell Th. Diabetes and the Eyes. Oxford: Blackwells. 1969:81-7.
25. Kohner Em, Oakley Nw. Progress in Endocrinology and Metabolism. Metabolism. 1975; 24:1085-102.
26. Oakley N, Hill Dw, Joplin Gf, Et Al. Diabetic Retinopathy: The Assessment of Severity and Progress by Comparison with a Set of Standard Fundus Photographs. Diabetologia. 1967; 3:402-5.
27. Kansky J. Clinical Ophtalmology. 1994;3rd edition:344-57.
28. Phillips Wb. Ocular Manifestations of Diabetes Mellitus. J Ophthalmic Nurs Tecnol. 1994;13:255-61.
29. Lovestam-Adrian M, Agardh E, Agardh Cd. The Temporal Development of Retinopathy and Nephropathy in Type 1 Diabetes Mellitus During 15 Years Diabetes Duration. Diabetes Res Clin Pract. 1999;45:15-23.
30. Ribeiro-Gonçalves E, Barsante C. Retinopatia E Maculopatia Diabética. In: Dias JFR Ribeiro-Gonçalves E, Barsante C Diabetes e Hipertensão Arterial. 1984;1ª edição:1-25.
31. Klein R, Klein Bek, Moss Se, Et Al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. Xiv. Ten Year Incidence and Progression of Diabetic Retinopathy. Arch Ophthalmol. 1994; 112:1217-28.
32. The Diabetes Control and Complication T. N Engl J Med. 2000;342:381-9.
33. Prevención De Ia Ceguera En Ia Retinopatia Diabetica E. Revista Clínica Espafiola. 1998;198.
34. Fukuda M. Clinical Arrangement of Classification of Diabetic Retinopathy. Tohoku J ExMed. 1983;141:331-5.
35. Haut J, Redor Jy, Abboud E, Al E. Classification of Diabetic Retinopathy. Ophthalmologica. 1987;195:145-55.
36. Matsui M, Sato Y. Classification of Diabetic Retinopathy and Application Standard of Photocoagulation. Nippon Ganka Gakkai Zasshi. 1989;93:803-8.
37. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (Etdrs). Early Photocoagulation for Diabetic Retinopathy. Ophtalmology. 1991;98:766-85.
38. Munteanu G. The Classification of Diabetic Retinopathy. Oftalmologia. 1993;37:207-9.
39. American Diabetes Association. Guide to Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance. Diabetes Care. 1997;20(1):21-7.
40. Benson We. Diabetic Retinopathy. 1998 [updated 1998; cited v3. chapter 30]; Available from.

41. Smith Sc. Diabetic Retinopathy. Nurse Pract Forum. 1998;9:13-8.
42. Garcia-Serrano JI, Serrano-Laborda D, Lopez-Pozas M, Cabello-Aparicio C, Castro-Rosales L. [the Granada Diabetic Retinopathy Study. Direct Screening of 8,244 Patients. I]. Arch Soc Esp Oftalmol. 2007 Nov;82(11):681-9.
43. Fauser S, Krohne Tu, Kirchhof B, Joussen Am. Diabetic Maculopathy - Classification and Therapy. Klin Monatsbl Augenheilkd. 2003 Aug;220(8):526-31.
44. Hori S. [Chronic Complications Due to Diabetes Mellitus: Diabetic Retinopathy--Classification, Diagnosis, Treatment]. Nippon Rinsho. 2002 Oct;60 Suppl 10:147-54.
45. Library Exhibitions. Edinburgh: Royal College of Physicians; 2008 [updated 2008; cited 2008 24/01]; Available from: <http://www.rcpe.ac.uk/library/exhibitions/diabetes/diabetes.php>.
46. Engerman RI, Bloodworth Jr. Jmb. Experimental Diabetic Retinopathy in Dogs. Arch Ophthalmol. 1965;73:205-10.
47. Bloodworth Jr. Jmb, Molitor DL. Ultrastructural Aspects of Human and Canine Diabetic Retinopathy. Invest Ophthalmol. 1965;4: 1037-48.
48. Bloodworth Jr. Jmb, Engerman RI, Powers KI. Experimental Diabetic Microangiopathy: Basement Membrane Statistics in the Dog. Diabetes. 1969;18:455-8.
49. Leuenberger Pm, Cameron D, Stauffacher W, Et Al. Ocular Lesions in Rats Rendered Chronically Diabetic with Streptozotocin. Ophthalmic Res. 1971;2:189-204.
50. Babel J, Leuenberger P. A Long Term Study on the Ocular Lesions in Streptozotocin Diabetic Rats. Albrecht Von Graefes Arch Klin Ex Ophthalmol. 1974;189:191-209.
51. Duhault J, Lebon F, Boulanger M. Microangiopathie Diabetique-Etude Comparative Chez L'homme Et L'animal. Biorheology. 1974;11:167-78.
52. Rodrigues M, Currier C, Yoon J. Electron Microscopy of Renal and Ocular Changes in Virus-Induced Diabetes Mellitus in Mice. Diabetologia. 1983;24:293-9.
53. Takahashi Y. Optic Nerve Head Circulation in Alloxan-Induced Diabetic Rabbits. Nippon Ganka Gakkai Zasshi. 1995;99:166-72.
54. Mac Gregor LC, Matschinsky FM. Experimental Diabetes Mellitus Impairs the Function of the Retinal Pigmented Epithelium. Metabolism Clin Ex. 1986;35:28-34.
55. De Juan E, Humayun MS, Hatchell DL, Wilson D. Histopathology of Experimental Preretinal Neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1989;30:1495-503.
56. Buchi ER, Kurosawa A, Tso MO. Retinopathy in Diabetic Hypertensive Monkeys: A Pathologic Study. Albrecht Von Graefes Arch Klin Ex Ophthalmol. 1996;234:388-98.
57. Engerman RI. Animal Models of Diabetic Retinopathy. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol. 1976;81:710-5.
58. Papachristodoulou D, Heath H, Kang SS. The Development of Retinopathy in Sucrose-Fed and Streptozotocin-Diabetic Rats. Diabetologia. 1976;12:367-74.
59. Robison WG, McCaleb ML, Feld LG, Et Al. Degenerated Intramural Pericytes ("Ghost Cells") in the Retinal Capillaries of Diabetic Rats. Curr Eye Res. 1991;10:339-50.
60. Sima AA, Garcia-Salinas R, Basu PK. The B6 Wistar Rat: An Experimental Model for the Study of Diabetic Retinopathy. Metabolism. 1983;32:136-40.
61. Schellini SA, Gregorio EA, Spadella CT, Machado JI, De Moraes-Silva MA. Muller Cells and Diabetic Retinopathy. Braz J Med Biol Res. 1995;28:977-80.

62. Mclethie Ng. Alloxan Diabetes: The Sorcerer and His Apprentice. *Diabetologia*. 1982;23:72-5.
63. Kern Ts, Engerman RL. A Mouse Model of Diabetic Retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 1996;114:986-90.
64. Schellini Sa. Retinopatia Diabética Experimental: Estudo Estrutural, Ultraestrutural E Morfométrico Da Retina De Ratos Normais, Diabéticos E Diabéticos Tratados. Botucatu. 1992:160p.
65. Kern Ts, Engerman RL. Comparison of Retinal Lesions in Alloxan-Diabetic Rats and Galactose-Fed Rats. *Curr Eye Res*. 1994;13:863-7.
66. Robison Jr. Wg, Nagata M, Tillist N, Et Al. Aldose Reductase and Pericyte-Endothelial Cell Contacts in Retina and Optic Nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989a;30:2293-9.
67. Yanoff M, Fine Bs. Diabetes Mellitus. In: YANOFF, M *Patologia ocular*. 1991a:187-95.
68. Yanoff M, Fine Bs. Retina. In: ____ *Patologia ocular*. 1991b;11:131-52.
69. Lieth E, Barbera J, Xu B, Et Al. Glial Reactivity and Impaired Glutamate Metabolism in Short-Term Experimental Diabetic Retinopathy. *Diabetes*. 1998;47:815-20.
70. Kincaid Mc. Pathology of Diabetes Mellitus. 1998 [updated 1998; cited v.3 chapter 18]; Available from.
71. Moiser Ma, Gottner Mj. Identification of the Pre-Proliferative Diabetic Eye. *Metab Pediatr Syst Ophthalmol*. 1985;8:150-3.
72. Hamanaka T, Akabanem N, Yajima T, Et Al. Retinal Ischemia and Angle Neovascularization in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 2001;132:648-58.
73. Verma D. Pathogenesis of Diabetic Retinopathy-the Missing Link? *Med Hypotheses*. 1993;41:205-10.
74. Robison Jr. Wg, Tillist N, Laver N, Et Al. Diabetes-Related Histopathologies of the Rat Retina Prevented with an Aldose Reductase Inhibitor. *ExEye Res*. 1990;50:355-66.
75. Bazan Ng, Gordon Nc, Marcheselli Vl, Et Al. Experimental Models and Their Use in Studies of Diabetic Retinal Microangiopathy. *Therapie*. 1997;52:447-51.
76. Ishibashi T. Cell Biology of Intraocular Vascular Diseases. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 1999;103:923-47.
77. Almeida Cam. Estudo Das Alterações Estruturais E Ultra-Estruturais Da Camada De Fotorreceptores Da Retina De Ratos Diabéticos Aloxânicos. Botucatu: Universidade Estadual Paulista 2002.
78. Yanoff M. Ocular Pathology of Diabetes Mellitus. *Am J Ophthalmol*. 1969;67:21-38.
79. Jorge Ec. Retinopatia Diabética: Estudo Ultraestrutural E Morfométrico Do Epitélio Pigmentar De Ratos Normais E Aloxânicos; 1996.
80. Jorge Ec, Trindade Jcs. Retinopatia Diabética: Estudo Ultraestrutural E Morfométrico Do Epitélio Pigmentar De Ratos Normais E Aloxônicos. *Rev bras oftalmol*. 1997;56(7):461-78.
81. Hori S, Mukai N. Ultrastructural Lesions of Retinal Peripapillary Muller Cells in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Albrecht Von Graefes Klin ExOphthalmol*. 1980;213:1-9.

82. Rodrigues Acl, Schellini Sa, Spadela Ct, Gregório Ea, Padovani Cr. Alterações Vasculares Na Coróide De Ratos Diabéticos Tratados E Não Tratados. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2007;70:433-40.
83. Tilton R, Larose L, Kilo C, Jr W. Absence Ofdegenerative Changes in Retinal and Uveal Capillary Pericytes in Diabetic Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986;27(5):716-21.
84. Dryden Rm. Central Vein Oclusions and Chronic Simple Glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 1965;73:659-63.
85. Gartner S, Henkind P. Neovascularization of the Iris(Rubeosis Iridis). *Surv Ophthalmol*. 1978;22:291-312.
86. Wand M. Neovascular Glaucoma. In: In: RITCH R, SHIELDS, M.B., KRUPIN, T., editor. *The Glaucomas*. 2.ed. ed: St. Louis: Mosby; 1996. p. 1073-129.
87. Von Sallmann L, Grimes P. Eye Changes in Streptozotocin Diabetes in Rats. *Am J Ophthalmol*. 1971;1:312-9.
88. Fujii T, Ishikawa S, Uga S. Ultrastructure of Iris Muscles in Diabetes Mellitus. *Ophthalmologica*. 1977;174(4):228-39.
89. Spirandelli P, Schellini S, Gregório E, Padovani C. Ultrastructural and Morphometric Alterations in Iris Nerves of Diabetic Rats. *Invest Ophthalmol*. 1999;40:s446.
90. Pinto Ft. Alterações Morfológicas Nos Vasos Da Íris De Ratos Normais E Diabéticos Aloxânicos. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2002.
91. Kojima K Hy, Hirata K. Electron Microscopic Findings of the Ocular Tissues in Alloxan Rats - on the Vessels of the Iris and Ciliary Body. *Nippon Ganka Kiyo*. 1972;23:191-203.
92. Kojima K, Hasegawa Y, Hirata K. Electron Microscopic Findings of the Ocular Tissues in Alloxan Rats - on the Vessels of the Iris and Ciliary Body. *Nippon Ganka Kiyo*. 1972;23:191-203.
93. Bosso E. Alterações Morfológicas No Estroma Do Corpo Ciliar De Ratos Normais E Diabéticos Aloxânicos. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2002.
94. Elias H, Hyde D. A Guide to Pratical Stereology. Basileia: Karger; 1983.
95. Gundersen H, Bendtsen T, Korbol, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some New, Simple and Efficient Stereological Methods and Their Use in Pathological Research and Diagnosis. *APMIS*. 1988;96:379-94.
96. Aherne W, Dunhill M. Morphometry. São Paulo Edward Arnold; 1982.
97. Baar J, Oort J. A Manual of Morphometry in Diagnostic Pathology. Berlin; 1983.
98. Mandarim-De-Lacerda C. Métodos Quantitativos Em Morfologia. Rio de Janeiro: EdUERJ; 1995.
99. Baddeley A, Gundersen H, Cruz-Orive L. Estimation of Surface Area from Vertical Sections. *J Microsc*. 1986;142:259-76.
100. Chalkley H, Cornfield I, Park H. A Method for Estimating Volume-Surface Ratios. *Science*. 1949;110:295-7.
101. Weibel E, Gomez D. A Principle for Counting Tissue Structures on Random Sections. *J Appl Phisiol*. 1962;17:343-48.
102. Lopes-Paulo F. Emprego Da Estereologia Em Pesquisas Colorretais. *Rev bras coloproct*. 2002;22(2):73-6.

103. Figueiredo Mtbjap. Morphometric Analysis of Shank-to-Flute Ratio in Rotary Nickel Titanium Files. *International Endodontic Journal*. 2004;37(6):353.
104. Masiero A, Barletta F. Effectiveness of Different Techniques for Removing Gutta-Percha During Retreatment. *International Endodontic Journal*. 2005;38(1):2-7.
105. Chi F, Liang Q. The Quantification of Endolymphatic Hydrops in an Experimental Animal Model with Guinea Pigs. *Journal of Oto-Rhino-Laryngology & its Related Specialties*. 2004;66(2):56-61.
106. Yu Y, Ye X, Shou L. The Therapy with Rhveg Gene for Ischemic Tram Flap in Rats. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2003;19(5):373-6.
107. Sanchez Perez A, Honrubia Lopez F, Larrosa Poves J, Polo Llorens V, Melcon Sanchez-Frieras B. The Autocad System for Planimetric Study of the Optic Disc in Glaucoma: Technique and Reproducibility Study. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmología*. 2001;76(9):551-8.
108. Wang N, Lai M, Chen X, Zhou W. Quantitative Real Time Measurement of Iris Configuration in Living Human Eyes. *Chung-Hua Yen Ko Tsa Chih [Chinese Journal of Ophthalmology]*. 1998;34(5):369-72.
109. Weynand B, Jonckheere A, Frans A, Rahier J. Diabetes Mellitus Induces a Thickening of the Pulmonary Basal Lamina. *Respiration*. 1999;66:14-9.
110. Heath H. Experimentally Induced Retinopathies in Relation to the Problem of Diabetes. *Br Med Bull*. 1970;26:151.
111. Engerman R, Finkelstein D, Aguirre G, Et Al. Ocular Complications. *Diabetes*. 1982;31, suppl.1, pt.2:82-8.
112. Frank Rn. *Etiologic Mechanisms in Diabetic Retinopathy*. St. Luois: Mosby; 1989.
113. Orloff Mj, Lee S, Charters Ac, Et Al. Long-Term Studies of Pancreas Transplantation in Experimental Diabetes Mellitus. *Ann Surg*. 1975;182:198-206.
114. Macedo Ar, Skivolocki Wp, Thompson Kr, Et Al. Morphometric Electron - Microscopy Study of the Whole Pancreas Transplantation on Alloxan Diabetic Neuropathy. *Surg Forum*. 1981;32:379-80.
115. Macedo Cs, Greenleaf Ge, Syers Hj, Et Al. Effect of Whole Pancreas Transplantation on Long-Stablished Kidney Lesions in Diabetes. *Surg Forum*. 1985;36:346-8.
116. Macedo Cs, Mercadante Mcs, Macedo Ar. Controle Do Diabetes Por Meio Do Transplante De Ilhotas De Langerhans Preparadas Sem O Emprego Da Digestão Enzimática - Estudo Experimental No Rato. *Re Hos Clin Fac Med S Paulo*. 1986; 41:55-60.
117. Macedo Cs, Riyuzo Mk, Mercadante Mcs, Et Al, editors. *Nefropatia Diabética Em Ratos. Estudo Comparativo Entre a Diabetes Induzida Pela Aloxana E Pela Estreptozotocina*. JORNADA BRASILEIRA DE NEFROLOGIA PEDIÁTRICA; 1987; Rio de Janeiro. Sociedade Brasileira de Pediatria.
118. Spadella Ct. *Avaliação Funcional Do Transplante Pancreatoduodenal No Rato Diabético*. Botucatu: Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina de Botucatu; 1989.
119. 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 Do Rato*. Botucatu. 1990:127p.

120. Dunn Js, Sheehan Hl, Mclethchie Ngb. Necrosis of Islets of Langerhans Produce Experimentally. *Lancet*. 1943;1:484.
121. Robison Wg, Jr., Kador Pf, Kinoshita Jh. Retinal Capillaries: Basement Membrane Thickening by Galactosemia Prevented with Aldose Reductase Inhibitor. *Science*. 1983 Sep 16;221(4616):1177-9.
122. Gul N, Ozsoy N. The Ultrastructure of the Capillaries in the Gingiva of Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Cell Biochem Funct*. 2003 Dec;21(4):311-5.
123. Zhou Bq, Hu Sj, Wang Gb. The Analysis of Ultrastructure and Gene Expression of Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium Handling Proteins in Alloxan-Induced Diabetic Rat Myocardium. *Acta Cardiol*. 2006 Feb;61(1):21-7.
124. Galagudza Mm, Nekrasova Mk, Syrenskii Av, Nifontov Em. Resistance of the Myocardium to Ischemia and the Efficacy of Ischemic Preconditioning in Experimental Diabetes Mellitus. *Neurosci Behav Physiol*. 2007 Jun;37(5):489-93.
125. Caldwell Rb, Slapnick Sm, Mclaughlin Bj. Quantitative Freeze - Fracture and Filipin - Binding Study of Retinal Pigment Epithelial - Cell Basal Membranes in Diabetic Rats. *ExEye Res*. 1987;44:245-59.
126. Machado Jlm. Neuropatia Diabética Experimental. Estudo Morfológico E Morfométrico Do Nervo Ciático De Ratos Diabéticos. Botucatu. 1993:109p.
127. Clarson C, Daneman D, Martin J. Subclinical Diabetes Mellitus in the Bb Rat. *Diabetes Res*. 1986;3:237-40.
128. Lee S, Chandler Jg, Krubel R, Nakaji Nt, Rosen H, Orloff Mj. Relief of Diabetes Mellitus by Heterotopic Transplantation of the Whole Pancreas in Inbred Rats. *Surg Forum*. 1971;22:75-7.
129. Ueda T, Lee S, Sotreck G, Et Al. Metabolic Effect of Alloxan Diabetic Rats before and after Pancreas Transplantation. *Proc Anat Microsurg Soc*. 1979;3:423-4.
130. 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.
131. Rossi G, Heldstab A. Morphometric Studies of Pancreatic Islets and Retina Vessels of Rats with Streptozotocin - Induced Latent Diabetes. *Diabete Metab*. 1981;7:77-86.
132. Calderon Imp. Modelo Experimental Em Ratos Para Estudo Do Binômio Diabete E Gravidez. Botucatu. 1988:125p.
133. Karasik A, Menczer J, Pariente C, Kanety H. Insulin-Like Growth Factor-I (Igf-I) and Igf-Binding Protein-2 Are Increased in Cyst Fluids of Epithelial Ovarian Cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Feb;78(2):271-6.
134. Reddi As. Collagen Metabolism in the Retina of Normal and Diabetic Rats. *ExEye Res*. 1985;41:345-52.
135. Vinores Sc, Campochiaro Pa, May Ee, Et Al. Progressive Ultrastructural Damage and Thickening of the Basement Membrane of the Retinal Pigment Epithelium in Spontaneously Diabetic Bb Rats. *ExEye Res*. 1988;46:545-58.
136. Jonasson J, C.W., Bauman C, Et Al. The Pathophysiology of Experimental Insulin-Deficient Diabetes in the Monkey: Implications for Pancreatic Transplantation. *Ann Surg*. 1985;201:27-39.
137. Hogan Mj, Alvarado Ja, Weddell Je. Retina. In: *Hystology of the human eye*. 1971;9:393-519.
138. Rodrigues Ac. Coroidopatia Diabética. Estudo Ultraestrutural Da Coróide De Ratos Normais E Diabéticos Aloxânicos. Dissertação Botucatu. 2000:135.

139. Candia Oa, To Ch, Gerometta Rm, Zamudio Ac. Spontaneous Fluid Transport across Isolated Rabbit and Bovine Ciliary Body Preparations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Mar;46(3):939-47.
140. Jariyapongskul A, Rungjaroen T, Kasetsuwan N, Pathumraj S, Niimi H. Chronic Changes of the Iris Microvasculature of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Using Fluorescence Videomicroscopy. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006;34(1-2):283-93.
141. Hirschi Kk, D'amore Pa. Control of Angiogenesis by the Pericyte: Molecular Mechanisms and Significance. *EXS.* 1997;79:419-28.
142. Ishibashi T, Inomata H. Ultrastructure of Retinal Vessels in Diabetic Patients. *Br J Ophthalmol.* 1993 Sep;77(9):574-8.
143. Polak M, Newfield Rs, Fioretto P, Czernichow P, Marchase R. Pathophysiology of Diabetic Complications. *Diabetologia.* 1997 Oct;40 Suppl 3:B65-7.
144. Bosco A, Lerario Ac, Soriano D, Dos Santos Rf, Massote P, Galvao D, et al. [Diabetic Retinopathy]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005 Apr;49(2):217-27.
145. Kuwabara T, Cogan Dg. Retinal Glicogen. *Arch Ophthalmol.* 1961;66:96-104.
146. Kuwabara T, Cogan Dg. Studies of Retinal Vascular Patterns-Normal Architecture. *Arch Ophthalmol.* 1960;64:904-11.
147. Fisher Rf. Comparison of the Size of Pericytes of the Retinal Capillaries in the Normal and Diabetic State. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 1980 Apr;100(Pt 1):90-5.
148. Vom Hagen F, Feng Y, Hillenbrand A, Hoffmann S, Shani M, Deutsch U, et al. Early Loss of Arteriolar Smooth Muscle Cells: More Than Just a Pericyte Loss in Diabetic Retinopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2005 Dec;113(10):573-6.
149. Kakehashi A, Saito Y, Mori K, Sugi N, Ono R, Yamagami H, et al. Characteristics of Diabetic Retinopathy in Sdt Rats. *Diabetes Metab Res Rev.* 2006 Nov-Dec;22(6):455-61.
150. Mcmillan De. Development of Vascular Complications in Diabetes. *Vasc Med.* 1997;2(2):132-42.
151. Cooper Me, Bonnet F, Oldfield M, Jandeleit-Dahm K. Mechanisms of Diabetic Vasculopathy: An Overview. *Am J Hypertens.* 2001 May;14(5 Pt 1):475-86.
152. Stitt Aw, Gardiner Ta, Archer Db. Histological and Ultrastructural Investigation of Retinal Microaneurysm Development in Diabetic Patients. *Br J Ophthalmol.* 1995 Apr;79(4):362-7.
153. Cunha-Vaz J. Characterization and Relevance of Different Diabetic Retinopathy Phenotypes. *Dev Ophthalmol.* 2007;39:13-30.
154. Fryczkowski Aw, Hodes Bl, Walker J. Diabetic Choroidal and Iris Vasculature Scanning Electron Microscopy Findings. *Int Ophthalmol.* 1989 Jul;13(4):269-79.
155. Yanoff M, Fine Bs. *Ocular Pathology.* Hagerstown: Harper & Row. 1975:565-85.
156. Yamashita T, Becker B. The Basement Membrane in the Human Diabetic Eye. *Diabetes.* 1961 May-Jun;10:167-74.
157. Zhoungh Hj, Zhang Dm, Zhou M. [Effects of Losartan on Renal Ultrastructure in Diabetic Rats]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2001 Jun 28;26(3):200-2.
158. Zhou M, Zhong Hj, Wu Xy. [Changes of Ultrastructure and Function of the Aortic Endothelium in Streptozotocin-Diabetic Rats and Effect of Perindopril]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2001 Feb 28;26(1):41-4.

ALMEIDA, C.A.M. Avaliação ultra-estrutural dos vasos da íris, corpo ciliar e retina em ratos diabéticos aloxânicos. Botucatu, 2008. p.115 Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a influência do diabetes sobre os vasos da íris, corpo ciliar e retina. Para isto, foi realizado estudo experimental, utilizando 20 ratos da raça Wistar, divididos em dois grupos: Grupo Controle (GC) e Grupo Diabético (GD). A indução do diabetes foi feita por injeção de aloxana, 42 mg/Kg de peso. Os animais foram observados em 3 momentos experimentais: M1-15 dias após a indução do diabetes, M2 -1 mês após M1 e M3 -12 meses após M1. Foram considerados para o estudo os animais do GD que em M1 apresentavam diabetes grave. Realizou-se acompanhamento diário de parâmetros clínicos (peso, diurese, ingestão hídrica e ingestão alimentar) e avaliação mensal de glicemia e glicose urinária. Nos momentos experimentais M2 e M3 foram realizadas enucleação e preparo dos olhos para avaliação sob microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados obtidos mostraram que os animais diabéticos tiveram importante redução de peso, aumento de ingestão hídrica, aumento de ingestão alimentar e aumento de diurese, em relação aos animais controle. Na avaliação morfológica os três grupos de vasos tiveram alterações similares, com espessamento da membrana basal nas células endoteliais e pericitos, maior número de corpos densos, lisossomos, vesículas, vacúolos e "figuras de mielina", que estavam presentes em GCM2 e foram mais acentuadas nos grupos diabéticos. Não foram observados microaneurismas na parede vascular. A análise morfométrica mostrou aumento significativo na espessura da membrana basal de vasos irianos nos animais diabéticos. Concluí-se que os vasos da íris, corpo ciliar e retina sofrem a influência do estado diabético. As alterações são progressivas, afetando tanto as células endoteliais, como as pericíticas.

Palavras-chave: Diabetes; Aloxana; Ratos; Ultra-estrutura; Vasos.

ALMEIDA, C.A.M. Ultra-structural evaluation of the of the iris, ciliary's body and retina vessels in aloxanic diabetic rats. Botucatu, 2008. p.115 Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the influence of diabetes on vessels of iris, ciliary's body and retina. For this, prospective experiment was accomplished, using 20 Wistar rats, divided in two groups: Control Group (CG) and Diabetic Group (DG). The diabetes induction was made by aloxana injection, 42 mg/Kg of weight. The animals had been observed at 3 experimental moments: M1-15 days after the diabetes induction, M2 - 1 month M1 and M3 -12 months after M1. They were considered for the study the animals of the DG that presented serious diabetes in M1. Clinical parameters had daily been followed (weight, diuresis, water ingestion and alimentary ingestion) and monthly evaluation of glycemia and urinary glucose. At the experimental moments M2 and M3 it was realized enucleation and preparation of the eyes for optic microscopy and electronic transmission microscopy evaluation. The gotten results had shown that the diabetic animals had had important weight reduction, water ingestion increase, alimentary ingestion increase and diuresis increase, compared to the animals of the CG. In the morphologic evaluation it has been observed that the three groups of vessels have had similar alterations, with thickening of the basal membrane in the endothelial cells and pericytes, greater number of dense bodies, lysosomes, vesicles, vacuoles and "myelin figures" that they were in GCM2 and had been accentuated in diabetic groups. Microaneurysms in the vascular wall had not been observed. The morphometric analysis showed significant increase in the thickness of the basal membrane of iris vessels in diabetic animals. We conclude that iris, ciliary's body and retina vessels suffer the influence from the diabetic state. The alterations are gradual, affecting in such a way the endothelial cells, as the pericytes.

Keywords: Diabetes; Aloxana; Rats; Ultra-structure; Vessel.