

Carla Albertina Martins Almeida

**Estudo das alterações estruturais e ultra-estruturais da
camada de fotorreceptores da retina de ratos diabéticos
aloxânicos**

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

Orientador: Prof. Livre Docente César Tadeu Spadella

BOTUCATU
2002

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

Almeida, Carla Albertina Martins

Estudo das alterações estruturais e ultra-estruturais da camada de fotorreceptores da retina de ratos diabéticos aloxânicos / Carla Albertina Martins Almeida. – 2002.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2002.

Orientador: César Tadeu Spadella

1. Retina – Diabetes

CDD 617.73

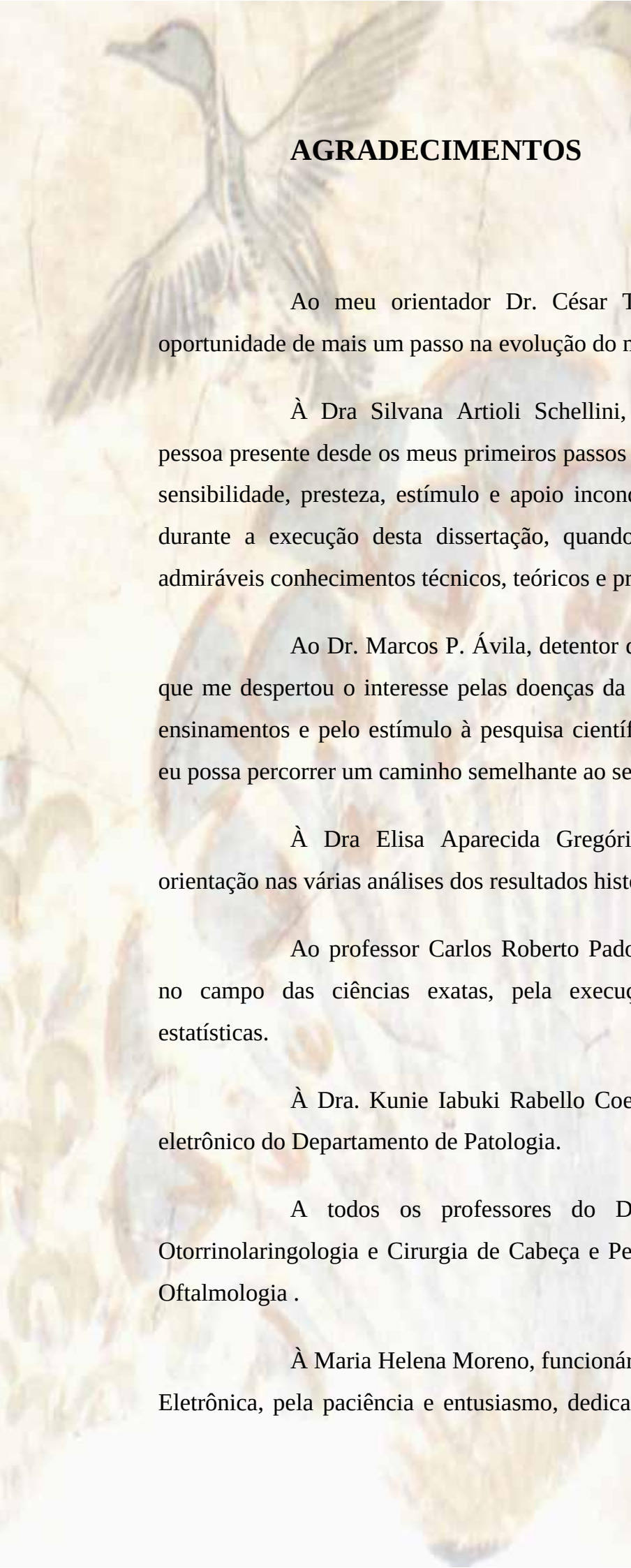
Palavras-chave: Retina; Diabetes; Aloxana; Ratos; Ultra-estrutura; Fotorreceptor; Cones; Bastonetes; Camada Nuclear Externa



**A Deus, à minha mãe, Cida
e ao meu pai, Carlos, sem
os quais minha vida não
seria possível.**

**Ao meu marido, Armando,
pelo estímulo e carinho.**

**Ao meu irmão, Moacir,
pela paciência e
disponibilidade em todos os
momentos.**



AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. César Tadeu Spadella, por me dar a oportunidade de mais um passo na evolução do meu aprendizado.

À Dra Silvana Artioli Schellini, mais que professora e amiga, pessoa presente desde os meus primeiros passos na oftalmologia, por sua incrível sensibilidade, presteza, estímulo e apoio incondicional em todos os momentos durante a execução desta dissertação, quando compartilhou seus valiosos e admiráveis conhecimentos técnicos, teóricos e práticos.

Ao Dr. Marcos P. Ávila, detentor de grande capacidade intelectual, que me despertou o interesse pelas doenças da retina e vítreo, através dos seus ensinamentos e pelo estímulo à pesquisa científica, encaminhando-me para que eu possa percorrer um caminho semelhante ao seu.

À Dra Elisa Aparecida Gregório, pela incansável e eficiente orientação nas várias análises dos resultados histológicos.

Ao professor Carlos Roberto Padovani, com sua capacidade inata no campo das ciências exatas, pela execução e orientação nas análises estatísticas.

À Dra. Kunie Iabuki Rabello Coelho pela cessão do microscópio eletrônico do Departamento de Patologia.

A todos os professores do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, pela minha formação em Oftalmologia .

À Maria Helena Moreno, funcionária do laboratório de Microscopia Eletrônica, pela paciência e entusiasmo, dedicação e profissionalismo com que



me orientou durante os trabalhos de preparo do material e micrografias das áreas de estudo.

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

Ao funcionário do departamento de Patologia, Carlos César Ramos, pela maneira atenciosa com que me atendeu em todas as oportunidades.

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

Aos funcionários:

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

- Departamento de Cirurgia: Simone Barroso Corvino Camargo;

- Biblioteca: Luciana Pizzani, Maria Aparecida Côrrea, Elza Numata;

- Departamento de Oftalmologia: Elizete Simião, Sílvia Helena Batista, Carlos Alberto Martins e Flávia Oliveira,

Pelo tratamento carinhoso dispensado durante a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

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



***“Que a estrada
se abra a sua frente. Que o
vento sopra levemente às suas
costas. Que o sol brilhe morno
e suave em sua face. Que a
chuva caia de mansinho em
seus campos. E até que nos
encontremos de novo que Deus
lhe guarde na palma de Suas
mãos”. (Prece Irlandesa)***

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	07
1. Definição	07
2. Histórico	07
3. Diabetes mellitus (DM)-classificação, diagnóstico e epidemiologia	11
4. DM – fisiopatologia e manifestações sistêmicas	15
5. DM – manifestações oftalmológicas	21
6. Retinopatia Diabética (RD)	27
6.1. Epidemiologia	27
6.2. Fisiopatologia, classificação e manifestações clínicas	30
7. Estrutura e ultraestrutura da retina normal	39
8. RD - Estudos morfológicos	42
9. RD – Estudos experimentais	42
OBJETIVOS	47
MATERIAL E MÉTODO	48
1. Animais utilizados	48
2. Grupos experimentais	49
3. Momentos experimentais	49
4. Parâmetros estudados	49
4.1. Parâmetros clínicos	49
4.2. Parâmetros bioquímicos	50
4.3 Parâmetros morfológicos	50
5. Sequência dos tempos experimentais	51
6. Técnicas utilizadas	52
6.1. Indução do diabetes experimental	52
6.2. Manutenção dos animais	53
6.3. Coleta de material para obtenção dos dados clínico laboratoriais	54
6.4. Exames bioquímicos	55
6.5. Sacrifício dos animais	56
6.6. Preparo dos olhos para exame morfológico	56
6.7. Documentação fotográfica	61
6.8. Análise estatística	62
RESULTADOS	63
1. Avaliação clínica	63
2. Parâmetros clínicos	64
2.1. Peso	64
2.2. Diurese	65
2.3. Ingestão hídrica	66
2.4. Ingestão alimentar	67
3. Parâmetros bioquímicos	68
3.1. Glicemia	68
3.2. Glicose urinária	69
4. Exame morfológico	70
4.1. Microscopia óptica	70
4.2. Microscopia eletrônica	72
FIGURAS	77
DISCUSSÃO	90
CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
SUMÁRIO	138
ABSTRACT	139

INTRODUÇÃO

1. DEFINIÇÃO

O diabetes é um grupo de síndromes, caracterizadas por hiperglicemia. É uma doença sistêmica, crônica e evolutiva, de etiologia múltipla, decorrente da deficiência absoluta ou relativa da secreção de insulina, por resistência celular à ação deste hormônio, ou pela combinação destes dois fatores. Alteram-se o metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas com um alto risco de complicações vasculares (Waife,1967; Bennett, 1994; Foster, 1998; Alberti & Zimmet, 1998).

2. HISTÓRICO

O diabetes é uma doença tão antiga quanto a própria humanidade. Alguns fatos de importância que constituem marcos durante o progresso das observações clínicas e das pesquisas em torno desta doença foram citados por Arduíno (1962, 1980) e estão listados a seguir:

- O papiro de Ebers, documento médico egípcio escrito cerca de 1.500 anos antes de Cristo (a.C.), faz referência a uma doença caracterizada por emissão freqüente e abundante de urina.

- Celsus, médico romano (30 a.C. - 50 depois de Cristo), descreveu o diabetes como uma “poliúria indolor, mas com emaciação e perigo”.

- Aretaeus, também médico romano (30 - 90), relatou uma doença cujos principais sintomas eram eliminação copiosa de urina, sede incontrolável e emagrecimento, atribuindo-a a influências perniciosas que afetariam a bexiga e os rins. Criou o termo *Dia-betes*, que significa “passar através”, pelo fato da poliúria, um dos sintomas mais aparentes, assemelhar-se à drenagem de água através de um sifão.

- Os hindus (século VI) descreveram em detalhes alguns sintomas da doença, assinalando pela primeira vez o gosto adocicado da urina no diabetes, dando o nome “Madhumeda” (urina doce), pelo qual era conhecido.

- Avicena (980-1027), grande médico árabe, forneceu também excelente descrição do diabetes, registrando a perda das funções sexuais como um de seus sintomas. Acreditava que fosse o fígado o órgão comprometido no diabetes e acrescentou o furúnculo e a tuberculose como complicações freqüentes da enfermidade, fazendo ainda menção à gangrena diabética e ao sabor adocicado da urina.

- Willis (1621-1675) definiu o diabetes como uma doença do sangue e diferenciou o Diabetes Mellitus do Insipidus.

- Brünner verificou (1682) que a retirada do pâncreas provocava poliúria e polidipsia sem, contudo, correlacionar este achado com o diabetes.

- A relação casual entre o diabetes e o pâncreas foi verificada pela primeira vez por Cawley, em 1788 d.C., ao observar a destruição do pâncreas em autópsia de um diabético.

- Rollo (1796) foi o primeiro médico a propor a restrição dietética no tratamento do diabetes, assinalando em um paciente o hálito cetônico.

- Von Fehling (1848) introduziu o reagente que tomou seu nome, para a pesquisa de glicose

- Bouchardat (1806-1886) utilizou-se dos métodos de fermentação e de redução do cobre para a pesquisa da glicose na urina. Valorizou a dieta no tratamento do diabetes, restringindo os carboidratos e aconselhando para substituí-los por gordura, álcool e vegetais verdes. Recomendava, além disso, os dias de jejum.

- Claude Bernard (1813-1878) descobriu a função glicogênica do fígado, considerando o glicogênio uma secreção interna.

Atribuiu o diabetes a um excesso de produção de açúcar por aquele órgão, demonstrando ainda a importância do sistema nervoso na regulação da glicemia.

- Langerhans (1869) descobriu as ilhotas celulares no tecido pancreático, confundindo-as com gânglios linfáticos.

- Estudando a influência do pâncreas na digestão das gorduras, os cirurgiões Mering e Minkowski (1889) verificaram que a estirpação do órgão no cão provocava o aparecimento de sintomas semelhantes aos do diabetes humano.

- Opie (1900) correlacionou o diabetes com a degeneração das ilhotas de Langerhans, reconhecendo sua função endócrina e diferenciando-as do tecido acinoso.

- A primeira distinção entre células alfa e beta das ilhotas de Langerhans foi realizada por Lane (1907).

Outros autores também apontam marcos históricos:

- Paulesco (1921), verificou que fatores constituintes do pâncreas controlavam o valor da glicose sanguínea em animais normais e sua ausência era a causa do diabetes, sendo isto um grande avanço (Ionescu-Tirgoviste, 1996).

- Defendendo a idéia de que o princípio secretado pelas ilhotas de Langerhans poderia ser destruído pela secreção externa do pâncreas, após exaustivos experimentos realizados no laboratório de MacLeod (Toronto), Banting, em colaboração com Best, Mac Leod e Collip (1922 d.C.), descobriu e isolou a isletina (insulina). Esses cientistas comprovaram que a injeção desse hormônio baixava a glicemia de cães pancreatectomizados, melhorando dramaticamente os sintomas da doença (Arduíno, F., 1962, 1980; Leickert, 1975; Ionescu-Tirgoviste, 1996).

Em 11 de janeiro de 1922 a primeira injeção de insulina foi aplicada no homem. A descoberta da insulina constituiu o marco culminante da história do diabetes e a maior conquista no campo do tratamento da doença. A descoberta da insulina valeu a Banting o Prêmio Nobel de Medicina (Arduíno, F., 1962, 1980; Leickert, 1975; Ionescu-Tirgoviste, 1996).

3. DIABETES MELLITUS (DM) – CLASSIFICAÇÃO, DIAGNÓSTICO E EPIDEMIOLOGIA

Os critérios de diagnóstico, nomenclatura e classificação atuais do DM, adotados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), são baseados nas recomendações da “American Diabetes Association” (ADA).

Esta atual classificação é baseada na etiopatogenia da doença e não mais na forma de tratamento, sendo que os termos diabetes mellitus insulino dependente e diabetes mellitus insulino independente foram abolidos, e os algarismos romanos I e II foram substituídos pelos arábicos 1 e 2 (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997; Alberti & Zimmet, 1998).

O diagnóstico do DM é feito pelo exame de glicemia de jejum com valor acima de 125mg/dl, confirmado por um segundo teste realizado após jejum de oito a dez horas. O teste de tolerância oral à glicose (TTOG) está indicado para pacientes em que a glicemia de jejum se apresenta entre 110 mg/dl e 125 mg/dl. Os valores do TTOG que confirmam o diagnóstico de D.M. são os maiores que 200 mg/dl, sendo denominados “Intolerância à Glicose”, os casos situados entre 140 mg/dl (limite máximo da normalidade) e 200 mg/dl (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997; Alberti & Zimmet, 1998).

O DM é classificado em quatro grupos: “Tipo 1”, “Tipo 2”, “Outros Tipos Específicos” e “Gestacional” (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997; Alberti & Zimmet, 1998).

O diabetes “Tipo 1” é caracterizado pela destruição das células beta-pancreáticas, o que leva a uma deficiência absoluta de insulina que, por sua vez, leva à cetose. Ocorre principalmente na infância e adolescência, mas pode ocorrer também no adulto diante de situações de estresse orgânico importante. Certos antígenos de histocompatibilidade (HLA) estão fortemente associados ao desenvolvimento deste tipo de DM. Pode ser de natureza auto-imune, com a presença de anticorpos anticélulas beta-pancreáticas ou idiopático. Representa cerca de 9% dos casos de diabetes (Nelson & Martyn, 1998; Foster, 1998; Sherwin, 2000).

O diabetes “Tipo 2” é um grupo heterogêneo, no qual existe resistência tecidual à insulina e liberação de insulina progressivamente diminuída. Neste grupo é muito freqüente a presença de obesidade, particularmente a do tipo central ou andróide, além de fatores hereditários. Varia de uma predominância de resistência insulínica, com relativa deficiência de insulina, a um defeito predominantemente secretório, com ou sem resistência insulínica. Representa cerca de 90% dos casos de DM (Foster, 1998; Sherwin, 2000).

A categoria "Outros Tipos Específicos de DM" inclui várias formas de DM, como as decorrentes de defeitos genéticos, endocrinopatias, doenças do pâncreas exócrino, infecções, ou ainda as associadas com outras doenças raras ou com o uso de fármacos causadores

de diabetes. O “DM Gestacional” abrange os casos de DM e de diminuição da tolerância à glicose detectada pela primeira vez na gravidez, podendo ou não persistir após o parto. Estes dois últimos grupos são responsáveis por cerca de 1% dos casos de diabetes (Alberti & Zimmet, 1998; Sherwin, 2000; American Diabetes Association, 1997).

A incidência do DM varia na população mundial. O DM afeta igualmente homens e mulheres e o seu risco aumenta com a idade. É uma das principais causas de morte, de invalidez e de cegueira em pessoas com idade entre 20 e 74 anos nos Estados Unidos da América (Harris et al., 1987), onde se estima que afete de 8 a 16 milhões de pessoas, com prevalência de 10% nas pessoas acima de 60 anos, aumentando para cerca de 16 a 20% na população com mais de 80 anos de idade; cerca de 50% dos pacientes ignoram ser portadores da doença (Wilson et al., 1986).

No Brasil estima-se que existam cerca de 5 milhões de indivíduos com DM, dos quais metade desconhece o diagnóstico, ou seja, a doença será identificada freqüentemente pelo aparecimento de uma de suas complicações. A prevalência do DM na população brasileira é de 7%, sendo maior na cidade de São Paulo, chegando a 9,7% na faixa etária de 30 a 69 anos e 13,4% na faixa de 60 a 69 anos, sendo semelhante à prevalência observada em vários países desenvolvidos, estas taxas são

confirmadas em estudos mais recentes (Malerbi & Franco, 1992; Oliveira et al.,1996).

4. DIABETES MELLITUS – FISIOPATOLOGIA E MANIFESTAÇÕES SISTÊMICAS

A alteração básica no DM é o distúrbio do metabolismo dos carboidratos, levando a graus variáveis de intolerância à glicose, hiperglicemia crônica e glicosúria, sendo que também ocorrem alterações do metabolismo lipídico e protéico (Felig & Bergman, 1995; Sherwin, 2000).

No diabetes tipo 1 o nível de insulina circulante é praticamente indetectável, o glucagon plasmático é elevado e as células beta não respondem aos estímulos insulinogênicos. Certos antígenos de histocompatibilidade (HLA) estão fortemente associados ao desenvolvimento do diabetes tipo 1. Cerca de 95% dos pacientes com diabetes tipo 1 são portadores de antígenos HLA-B8, -B15, -B18, -DR3 ou -DR4, em comparação a 45% a 50% dos controles. Além disso, anticorpos circulantes anticélula da ilhota foram detectados em 85% dos pacientes testados durante a fase precoce do diagnóstico. A maior parte dos anticorpos anticélula da ilhota são dirigidos contra a descarboxilase do ácido glutâmico (DAG), uma enzima da célula beta. Mais de 80% dos

pacientes com anticorpos positivos anticélula da ilhota apresentam anticorpos contra a DAG. Os pacientes diabéticos tipo 1, em geral, apresentam-se com poliúria, polidipsia, perda de peso e polifagia, que ocorrem a partir de níveis glicêmicos superiores a 200 mg/dl. A ação inadequada da insulina leva à hiperglicemia e produção de corpos cetônicos. Em crianças ocorre, com frequência, micção noturna (Nelson & Martyn, 1998; Foster, 1998; Sherwin, 2000).

No diabetes tipo 1, podemos observar com mais frequência o aparecimento das complicações agudas que podem apresentar um prognóstico ruim se não tratadas rápida e adequadamente, como cetoacidose diabética, hipoglicemia e coma hiperosmolar não cetótico (Foster, 1998; Sherwin, 2000).

Em pacientes com DM tipo 2, os dois principais defeitos fisiopatológicos são a resistência à ação da insulina e a secreção inadequada de insulina. O desenvolvimento de intolerância à glicose requer uma forte predisposição genética associada a fatores ambientais, tais como, o desenvolvimento de obesidade. Podemos verificar lesões em quaisquer órgãos, porém suas principais complicações são as vasculares, envolvendo rim e retina e as relacionadas à arteriosclerose generalizada, com aumento da frequência de doenças coronarianas, vasculares periféricas e acidentes vasculares cerebrais. Os diabéticos de longa

duração, em sua maioria, desenvolvem um quadro de neuropatia, nefropatia e retinopatia (Foster, 1998; Sherwin, 2000).

Os pacientes do tipo 2 têm uma evolução mais lenta, sendo muitas vezes assintomáticos, podendo existir hiperglicemia de grau suficiente para causar alterações funcionais e estruturais muito antes que o diagnóstico seja estabelecido. Desta maneira, antes do surgimento de hiperglicemia mantida, acompanhada do quadro clínico clássico do DM (poliúria, polidipsia e a perda rápida e inexplicada de peso), observa-se um estágio onde há distúrbio do metabolismo da glicose, caracterizado por valores glicêmicos situados entre a normalidade e a faixa diabética. Nestas circunstâncias, é freqüente a existência de complicações diabéticas na ocasião do diagnóstico da doença. Estima-se que cerca de 20% dos diabéticos do tipo 2 já têm algum tipo de complicação na ocasião do diagnóstico (Sherwin, 2000).

Característica quase patognomônica do diabetes, conseqüente de todas as alterações metabólicas, é o espessamento da membrana basal capilar, com inadequado fluxo sanguíneo em certas regiões críticas do organismo, levando a alterações decorrentes da macroangiopatia e microangiopatia (Felig & Bergman, 1995; Nelson & Martyn, 1998; Foster, 1998; Sherwin, 2000).

Alterações decorrentes da macroangiopatia são: doença arterial coronariana, doença vascular periférica (pé diabético) e doença arterial cerebrovascular, que também ocorrem em não-diabéticos. No entanto, a prevalência de infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral (AVC) é maior que o dobro em diabéticos em comparação a populações não diabéticas (Saudek, 1988). 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 (Panzram, 1987; King & Rewers, 1993).

O aumento da mortalidade cardiovascular dos pacientes diabéticos está relacionado ao próprio estado diabético, com suas alterações vasculares metabólicas e estruturais, e à agregação de vários outros fatores de risco como obesidade, hipertensão arterial (HA) e dislipidemia (Sherwin, 2000).

A doença vascular periférica aumenta o risco de amputações de membros inferiores, quando comparada à população não diabética (Saudek, 1988).

As principais alterações decorrentes da microangiopatia são a nefropatia, a neuropatia e a retinopatia (Sherwin, 2000).

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 (Saudek, 1988; Foster, 1998; Leys, 1998; Sherwin, 2000). A sua evolução é lenta e silenciosa. O sinal mais precoce é a perda, acima de valores normais, de proteínas na urina (microalbuminúria). Inicialmente, isto ocorre em quantidades muito pequenas e, mais tarde, já em fase não reversível, em grandes quantidades. A proteinúria que se manifesta, evolui para síndrome nefrótica e, desta, para insuficiência renal (Leys, 1998; Sherwin, 2000; American Diabetes Association, 1997). A ND ocorre em 20% dos pacientes com DM tipo 2 e em 40% dos do tipo 1 e é a principal causa de insuficiência renal, sendo que cerca de 26% dos pacientes que ingressam em programas de diálise são diabéticos (Saudek, 1988; Sherwin, 2000).

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 (Felig & Bergman, 1995; Leys, 1998; Sherwin, 2000).

A neuropatia diabética é complicação freqüente e precoce do DM, podendo atingir, a longo prazo, 80 a 100% dos pacientes, e pode 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 (Saudek, 1988; Sherwin, 2000).

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 sangüíneo endoneural (Sherwin, 2000).

A polineuropatia periférica é a forma mais comum, causando uma diminuição simétrica da sensibilidade distal em adição à perda de reflexos tendinosos. Esta perda de função nervosa pode estar associada com disestesia e hiperestesia, e pode predispor ao desenvolvimento de úlceras crônicas (pé diabético) (Robbins, 1975; Saudek, 1988; Felig & Bergman, 1995; Foster, 1998; Sherwin, 2000).

A neuropatia autonômica também é freqüente e pode se manifestar com gastroparesia, diarreia diabética noturna, hipotensão ortostática, disfunção erétil, arritmias cardíacas e bexiga neurogênica (com perda do seu tônus e sensibilidade, causando retenção urinária e infecções urinárias de repetição) (Saudek, 1988; Felig & Bergman, 1995).

Mononeuropatias também podem ocorrer. Há o envolvimento de apenas um nervo ou de uma raiz nervosa devido a uma oclusão da vasa vasorum, com hipóxia e desmielinização segmentar (Foster, 1998; Sherwin, 2000).

A retinopatia diabética (RD) é um dos pontos mais importantes da microangiopatia e será descrita isoladamente mais adiante.

5. DIABETES MELLITUS – MANIFESTAÇÕES OFTALMOLÓGICAS

A doença ocular é comum no diabetes, 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 (Olefsky, 1990).

Os olhos são atingidos de forma global e importante pelas alterações diabéticas, estando quase todas as estruturas oculares sujeitas a

lesões (Grey et al., 1986; Aiello & Cavallerano, 1994), sendo poucas as doenças sistêmicas que acometem o olho de uma maneira tão ampla e com tanta gravidade quanto o DM (Aiello & Cavallerano, 1994; Nelson & Martyn, 1998).

Os músculos extra-oculares podem apresentar paralisias, constituindo-se em uma neuropatia isolada (Benson, 1998).

As paralisias ocorrem geralmente sem outros sinais neurológicos, podendo haver dor periorbital no momento de sua instalação (Kraus et al., 1998; Nelson & Martyn, 1998). A recuperação da função muscular ocorre geralmente de 3 a 6 meses (Aiello & Cavallerano, 1994). Os nervos mais freqüentemente envolvidos são o abducente e o oculomotor (Aiello & Cavallerano, 1994; Nelson & Martyn, 1998).

Os vasos sanguíneos da conjuntiva bulbar podem apresentar microaneurismas, dilatação venosa e fragilidade capilar aumentada, com hemorragias subconjuntivais mais freqüentes que em indivíduos não-diabéticos (Armaly & Baloglou, 1967; Aiello & Cavallerano, 1994; Nelson & Martyn, 1998).

Deficiências no filme lacrimal podem resultar em olho seco (Dogru et al., 2001).

Nas pálpebras há uma maior incidência de xantelasmas (Aiello & Cavallerano, 1994; Nelson & Martyn, 1998).

O diabético é mais predisposto às infecções, principalmente estafilocócicas, como blefarites, meibomites, conjuntivites, hordéolos, canaliculites, dacriocistites e celulites orbitárias que são mais freqüentes em diabéticos que na população não diabética (Aiello & Cavallerano, 1994).

A córnea pode apresentar hipoestesia, resultante de uma polineurite difusa do nervo trigêmio e de seus ramos podendo estar associada à neuropatia periférica generalizada do DM, correlacionada à duração da doença. (Benson, 1998; Kincaid, 1998; Nelson & Martyn, 1998). A redução da sensibilidade corneana e a presença de olho seco, associados à distrofia da membrana basal do epitélio, aumentam o risco de aparecimento de erosões recorrentes e úlceras neurotróficas de córnea (Kincaid, 1998).

Pode haver aumento da espessura da córnea, devido a edema subclínico, decorrente de alterações morfológicas do endotélio, que é mais susceptível ao estresse que o endotélio do indivíduo normal (Aiello & Cavallerano, 1994; Kincaid, 1998).

Os diabéticos podem apresentar borramento temporário da visão e alterações na refração, provavelmente devido a alterações osmóticas na forma do cristalino, em consequência de flutuações na glicemia. Essas alterações podem ser desconcertantes, mas os pacientes devem ser aconselhados a não procurar novas refrações até que seja obtido um período estável de controle metabólico. Podem transcorrer 6 a 8 semanas antes que desapareçam as alterações da acuidade visual induzidas pela hiperglicemia (Olefsky, 1990). Geralmente consistem de miopias transitórias e são de aparecimento súbito em hiperglicemias, em geral, maiores que 300 mg/dl (Slamovits & Glaser, 1998).

Embora a catarata seja comum no diabetes, não foi rigorosamente demonstrado que a incidência de opacidades do cristalino está aumentada nesta condição. Em geral, a catarata nos diabéticos é indistinguível da catarata senil dos pacientes não-diabéticos, e as indicações de cirurgia são as mesmas que nos não-diabéticos. É possível que a presença do diabetes acelere o

desenvolvimento de catarata senil, de forma que esta ocorreria numa idade mais precoce que nos não-diabéticos. Tem sido postulado que a hiperglicemia leva ao aumento da produção de sorbitol no cristalino, resultando em alterações osmóticas que aceleram a formação da catarata. Embora haja evidências a favor desta teoria, a mesma ainda não foi provada. Ocasionalmente são observadas, em pacientes jovens cujo diabetes está sendo mal controlado, opacidades no cristalino denominadas catarata em “flocos de neve” (Olefsky, 1990; Mello et al, 1994).

O processo natural de liquificação do vítreo, que ocorre com o aumento da idade, manifesta-se com mais frequência e mais precocemente em pacientes diabéticos que nos não-diabéticos (Yanoff & Fine, 1975; Kincaid, 1998).

No nervo óptico, o principal achado associado à RD proliferativa é a neovascularização do disco óptico (Aiello & Cavallerano, 1994). 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 diabética proliferativa (Benson, 1998; Kincaid, 1998).

Os achados mais freqüentes na íris de pacientes diabéticos são a presença de vacúolos no epitélio pigmentar posterior e a presença de neovascularização (rubeosis iridis) (Yanoff & Fine, 1975; Aiello & Cavallerano, 1994; Kincaid, 1998).

Os diabéticos possuem, com freqüência, pupila pouco reativa a estímulos luminosos, e também aos medicamentos que promovem sua dilatação. Isto ocorre provavelmente devido às alterações

diabéticas degenerativas dos nervos e/ou músculos envolvidos neste mecanismo (Kincaid, 1998). Alterações ultra-estruturais importantes nos nervos da íris de ratos diabéticos já foram descritas (Spirandelli et al., 1999).

Os portadores de DM estariam mais predispostos ao aparecimento de hipertensão ocular e também mais sujeitos ao desenvolvimento de glaucoma que os não-diabéticos (Shields, 1989, Klein, 1994 b).

Aiello & Cavallerano (1994) referem que os tipos de glaucoma que com maior frequência se relacionam ao diabetes são o glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) e o glaucoma neovascular, sendo que, segundo estes autores, o GPAA é 1,4 vez mais freqüente na população diabética que na não-diabética.

O glaucoma neovascular ocorre em diabéticos como uma manifestação secundária à RD proliferativa significativa; a ocorrência do glaucoma neovascular está diretamente relacionada à duração do diabetes, sendo infrequente em pacientes com menos de 15 anos de duração da doença (Aiello & Cavallerano, 1994; Wand, 1996; Sassani, 1998; Sassani et al., 1998).

Apesar da doença diabética afetar quase todas as estruturas oculares, são as alterações retinianas as mais temíveis.

6. RETINOPATIA DIABÉTICA

6.1 EPIDEMIOLOGIA

A RD é uma doença que afeta jovens ou idosos, de caráter crônico e progressivo (Duke-Elder, 1967).

A incidência da RD está aumentando no mundo todo (Cunha-Vaz, 1978), tornando-a uma das principais causas de cegueira adquirida (Sorsby 1973; Culliman, 1982).

Estima-se que 2% da população diabética seja cega e que os diabéticos tem de 10 a 25 vezes mais propensão à cegueira que a população normal (Fundação Hilton Rocha, 1987; Smith, 1992).

Nos EUA, a RD é a principal causa de cegueira na população em idade produtiva (Kohner & Barry, 1984; Weigeist, 1989; Chen, 1995).

Existem cerca de 700.000 americanos com RD proliferativa e em torno de 50.000 americanos cegos por diabetes, havendo 5.800 casos novos a cada ano no país (Mazze et al., 1985; Chen, 1995).

Na Grã-Bretanha, 10% dos cegos são diabéticos (Kenn, 1972).

Na cidade de São Paulo, encontrou-se RD não proliferativa em 34,06%, e proliferativa em 9,42% dos pacientes diabéticos examinados (Hirata et al. 1986). No Brasil, os pacientes procuram tratamento quando a retinopatia já se encontra em fase avançada, o que piora as possibilidades de tratamento (Abujamra, 1986).

A RD é, também, importante indício prognóstico. Cinquenta por cento dos indivíduos com RD possuem alterações renais, e a sobrevida média de portadores de retinopatia proliferativa é de cinco anos (Caird et al., 1969; Kohner & Oakley, 1975).

A ausência de retinopatia pode ser correlacionada com o aumento da sobrevida dos diabéticos (Oakley et al., 1967).

Muitos fatores de risco influenciam a incidência e a progressão da RD (Klein et al., 1994 a). A duração do DM é um dos mais

importantes destes fatores, aumentando a frequência e a severidade da retinopatia (Ashton, 1958; Kohner & Oakley, 1975; Klein et al., 1984 a, b; Foss, 1992; Taylor, 1997).

O maior tempo de evolução do DM, leva à maior incidência de RD e ao aumento de casos de RD proliferativa (Philips, 1994; Lovestam-Adrian, 1999).

A idade do indivíduo, quando do diagnóstico do diabetes, é outro fator importante. A RD é rara em crianças menores de 10 anos (Palmberg et al., 1981; Frank et al., 1982; Jackson et al., 1982; Klein et al., 1984 a). As causas desse efeito protetor da idade ainda são desconhecidas. Sabe-se, porém, que a secreção do hormônio do crescimento e outras mudanças hormonais influenciariam o aumento da incidência da retinopatia na puberdade. Este fato é comprovado por não se observar incidência de retinopatia em anões diabéticos (Merimee, 1973) e por observar-se que, em 10 anos de seguimento de pacientes diabéticos, houve maior incidência e maior progressão da RD no grupo diagnosticado antes dos 30 anos de idade (Klein et al., 1994 a).

O controle metabólico do DM também é importante fator no aparecimento, progressão e gravidade da RD, sendo que pacientes tratados de forma intensiva (objetivando glicose sanguínea e hemoglobina glicosilada o mais próximo possível do normal), tem reduzido o risco de

complicações microvasculares havendo, portanto, forte associação entre o grau do controle metabólico e o desenvolvimento de retinopatia que piore potencialmente a visão (Klein, 1994 a; Lovestam-Adrian, 1999; The Diabetes Control and Complication Trial, 2000).

O tratamento com insulina é associado a vários fatores de risco que pioram a acuidade visual, como RD proliferativa e maculopatia (Taylor, 1997).

A HA é o fator secundário de risco mais importante para RD, sendo que os pacientes hipertensos e diabéticos têm 2 vezes mais chance de redução da visão, comparados com os diabéticos não hipertensos. Os mecanismos desta piora da RD não são totalmente conhecidos (Hammes, 1994).

6.2 FISIOPATOLOGIA, CLASSIFICAÇÃO E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

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 (Olefsky, 1990; Yanoff & Fine, 1991 a, b; Benson, 1998; Nelson & Martyn, 1998; Lieth, 1998).

As primeiras manifestações microestruturais são o espessamento da membrana basal dos vasos e a diminuição do número de pericitos vasculares. Os capilares retinianos exibem um aumento na coloração com ácido periódico de Schiff (PAS), dilatação capilar e varicosidades (Robison, 1991; Schellini, 1992; Hammes, 1994).

O aumento da concentração de glicose atua diretamente nos pericitos, células endoteliais e membranas basais, gerando, através de reações enzimáticas, substâncias chamadas produtos finais da glicosilação avançada (AGEs), que reagem com proteínas, linfócitos, macrófagos e antioxidantes, produzindo acúmulo de sorbitol e galacticol que alteram a membrana celular levando a microtromboses, isquemia e neovasos (Malenfant, 1995).

A obliteração capilar na RD pode ocorrer por um ciclo acelerado de morte e renovação das células capilares que mudam a arquitetura do vaso até sua obliteração, comprovado por aumento de defeitos apoptóticos (Mizutani, 1996).

Alterações enzimáticas e de oxigenação, também estão implicadas na origem da RD.

A angiotensina II estimula a expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um fator angiogênico e indutor

de permeabilidade, implicado na gênese da RD; a inibição da enzima conversora da angiotensina II (ECA), teria efeito benéfico reduzindo a proliferação e permeabilidade vascular (Gilbert, 2000).

Estudos recentes mostram que o VEGF está com expressão aumentada em pacientes com RD, mesmo quando “background”, sem sinais ainda de oclusão vascular. Os AGEs são estímulo para aumento do VEGF e o controle da glicemia com uso de troglitazone inibe a proliferação, migração e formação de células vasculares endoteliais, em um modelo animal, podendo reduzir a incidência de neovascularização em olhos diabéticos (Ishibashi, 1999).

A mudança na pressão parcial de oxigênio na retina, após o tratamento com inalação de oxigênio, parece ser um bom fator preditivo do risco de desenvolvimento de RD, bem como da avaliação da eficácia do tratamento em RD experimental (Berkowitz, 2001).

Há também defeitos específicos no metabolismo das células gliais, com dificuldade na conversão do glutamato em glutamina, causando acúmulo de glutamato e toxicidade celular (Lieth, 1998).

A HA poderia acelerar a progressão da RD, pois o aumento da pressão arterial leva a maiores depósitos de proteínas glicosiladas nos vasos retinianos (Hammes, 1994).

Não há um consenso absoluto na classificação da RD, sendo que diversos autores apresentam propostas de classificar a RD de acordo com fatores clínicos, prognósticos ou diagnósticos (Fukuda, 1983, Haut, 1987; Matsui, 1989; Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS), 1991; Munteanu, 1993).

A RD pode ser classificada como: retinopatia não proliferativa ou “background”, e retinopatia proliferativa (ETDRS, 1991; American Diabetes Association, 1997; Benson, 1998; Nelson & Martyn, 1998; Smith, 1998).

A retinopatia não-proliferativa pode incluir anormalidades venosas, microaneurismas, hemorragias retinianas, edema retiniano e exsudatos. Isto pode progredir para retinopatia proliferativa, caracterizada por neovascularização, proliferação glial e tração vitreo-retiniana (Olefsky, 1990).

Outra classificação mais detalhada da RD seria:

Retinopatia diabética não proliferativa (RDNP):

- Microaneurismas retinianos.
- Hemorragias ocasionais.
- Exsudatos.duros
- Um ou dois exsudatos algodonosos.

RD pré proliferativa:

- Vasos em “contas de rosário”.
- Áreas significantes de grandes hemorragias.
- Múltiplos exsudatos algodinosos (infartos das fibras nervosas).
- Múltiplas anormalidades microvasculares intraretinianas.

RD proliferativa (RDP):

- Neovasos no disco óptico (NVD).
- Neovasos em qualquer outro lugar da retina (NVE).
- Hemorragia vítrea ou pré retiniana.
- Proliferação de tecido fibroso.

RDP de alto risco:

- NVD Com ou sem hemorragia vítrea ou pré retiniana.
- NVE com hemorragia vítrea ou pré retiniana.

Edema macular diabético (pode ocorrer em RDNP ou RDP):

- Espessamento retiniana a menos de 2 diâmetros de disco do centro da mácula.
- Exsudato duro a menos de 2 diâmetros de disco do centro da macula, associado a espessamento da retina .
- Área de não perfusão dentro das arcadas vasculares temporais.
- Combinação de qualquer dos 3 itens anteriores.

6.2.1 RETINOPATIA NÃO-PROLIFERATIVA

Provavelmente a primeira alteração retiniana é o aumento da permeabilidade capilar, observado na angiografia com fluoresceína. Esta anormalidade pode ser imediatamente revertida pelo controle glicêmico eficaz. Mas, a relação entre esta forma de permeabilidade capilar e a retinopatia é desconhecida. A não-perfusão dos capilares retinianos ocorre no início da RD (denominada fechamento capilar), e isto leva a áreas de isquemia e infarto retiniano. 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 algodoados, 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 algodonas indica fechamento capilar progressivo e é um sinal prognóstico sombrio

(Olefsky, 1990; Yanoff & Fine, 1991; Benson, 1998; Nelson & Martyn, 1998; Lieth, 1998).

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 (Olefsky, 1990; Yanoff & Fine, 1991 a, b; Benson, 1998; Nelson & Martyn, 1998; Lieth, 1998).

6.2.2 RETINOPATIA PROLIFERATIVA

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 (Benson, 1998; Kincaid, 1998; Nelson & Martyn, 1998).

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, com liberação local de fatores promotores do crescimento (Olefsky, 1990).

A presença de mais de um achado dentre os seguintes: anormalidades venosas, anormalidades microvasculares intra retinianas, exsudatos algodinosos, evidência de não perfusão à angiografia fluoresceínica, podem indicar um estágio pré proliferativo, que aumenta a chance de proliferação fibrovascular (Moiser, 1985).

Em pacientes com RDP, 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 (Hamanaka, 2001).

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 (Verma, 1993).

A fotocoagulação é o tratamento de escolha para a retinopatia diabética proliferativa. Com este tratamento, focaliza-se um feixe luminoso na retina para produzir uma queimadura ou coágulo numa área precisamente definida (Olefsky, 1990).

Por este método, pode-se destruir seletivamente microaneurismas, vasos com extravasamento, elementos neovasculares e áreas de microinfarto ou edema. A destruição dos vasos propensos à hemorragia ou responsáveis por tração, evita diretamente mais deterioração. A destruição das áreas da retina que são mal perfundidas e hipóxicas, diminuiria o estímulo isquêmico para a neovascularização, evitando outras alterações proliferativas. Independentemente do mecanismo, o estudo do ETDRS mostrou claramente que a fotocoagulação diminui a incidência de descolamento da retina, hemorragia e perda da visão. Portanto, a fotocoagulação envolve tratamento seletivo dos novos vasos, assim como tratamento panretiniano para destruir 20 a 30% do tecido retiniano remanescente.

A fotocoagulação também seria útil na retinopatia proliferativa, como indicado pelos resultados do Diabetic Retinopathy Study (1981).

Os pacientes com RD apresentam índices elevados de queixas visuais antes do primeiro tratamento com fotocoagulação, a despeito do fato de que a detecção da RD deveria ocorrer antes da perda visual (Bailey, 2001).

Já que a cura do DM não é ainda possível, todos os pacientes com RD devem ser acompanhados periodicamente por um oftalmologista tão logo o diagnóstico seja efetuado e o tratamento adequado, por exemplo, a fotocoagulação ou até mesmo a cirurgia vítreo retiniana, instituído assim que haja indicação. Desta forma, a maioria dos casos de cegueira por RD poderá ser prevenida ou significativamente retardada (Olefsky, 1990; Philips, 1994).

Além disto, é muito importante a parceria entre o clínico e o oftalmologista, para que haja detecção mais precoce da RD com significante melhora do prognóstico. Os exames de rotina, que devem ser repetidos durante toda a vida, são essenciais para estes pacientes (Chen, 1995; Lovestam-Adrian, 1999; Aiello, 2001; Lovestam-Adrian, 2001).

7. ESTRUTURA E ULTRA-ESTRUTURA DA RETINA NORMAL

A retina é a túnica interna do globo ocular e apresenta uma porção posterior sensitiva e uma porção anterior não-sensitiva ou cega. Esta última porção cobre o corpo ciliar, os processos ciliares e a região posterior da íris.

Sua origem embriológica é a vesícula encefálica anterior ou prosencéfalo que, durante sua evolução, aprofunda-se no centro para formar o cálice óptico (McDonnel, 1989).

A parte mais externa do cálice forma o epitélio pigmentar da retina. A retina sensorial tem origem na parede interna do cálice óptico e é constituída por nove camadas celulares que são de fora para dentro: camada de fotorreceptores (cones e bastonetes - camada-alvo deste estudo), membrana limitante externa, camada plexiforme externa, camada nuclear interna, camada plexiforme interna, camada de células ganglionares, camada de fibras nervosas e membrana limitante interna (Blanks, 1989). Há quem considere o epitélio pigmentar também como uma das camadas retinianas.

A nutrição retiniana se faz pela coróide e pela artéria central da retina. Como no caso do cérebro, as células endoteliais dos vasos

retinianos possuem junções compactas ou junções íntimas, produzindo uma barreira a passagem de substâncias, conhecida como barreira hemato-retiniana (Yanoff & Fine, 1991 a).

Os cones e bastonetes são células com dois pólos, cujo único dendrito é fotossensível, enquanto o outro pólo estabelece sinapse com as células chamadas bipolares.

Os prolongamentos fotossensíveis (dendritos) assumem a forma de cone ou bastonete, daí os nomes dados a essas células. Tanto os cones como os bastonetes parecem atravessar uma estrutura homogênea, a membrana limitante externa. Estudos utilizando a microscopia eletrônica de transmissão mostraram ser esta membrana, imagem formada por uma série de complexos juncionais entre as células fotorreceptoras e as células de Müller. Os núcleos dos cones geralmente se dispõem em uma só altura e perto da membrana limitante, o que não ocorre com os núcleos dos bastonetes. As porções receptoras dessas células, isto é, os cones e bastonetes, apresentam uma ultra-estrutura complexa (Hogan, 1971).

A luz, quando atinge a retina, atravessa várias camadas e é absorvida parcialmente pelos cones e bastonetes, iniciando o processo visual. Este processo é extraordinariamente sensível, bastando um único fóton luminoso para estimular um fotorreceptor. Num segundo estágio, o pigmento visual é restaurado, podendo iniciar o processo novamente

(Junqueira & Carneiro, 1982).

Embora a retina contenha cerca de 126 milhões de receptores, nem toda a informação chega ao sistema nervoso central, existindo uma seleção por parte das células bipolares e ganglionares. Elas codificam e integram a informação recebida. A retina é, portanto, uma estrutura receptora-integradora extremamente complexa (Dowling, 1970).

8. RETINOPATIA DIABÉTICA - ESTUDOS MORFOLÓGICOS

Antes de 1925, poucos olhos com RD não complicada por outras patologias, como descolamento de retina ou glaucoma, foram examinados histologicamente. Ballantyne foi um dos grandes estudiosos desta patologia, investigando-a clínica e anatomopatologicamente. Juntamente com Lowenstein, observaram que as hemorragias puntiformes, vistas à fundoscopia, poderiam, na realidade, tratar-se de microaneurismas. Observaram, também, engurgitamento venoso e degeneração gordurosa na parede vascular, sugerindo que o fator etiopatogênico fosse uma toxina química (Ballantyne & Lowenstein, 1943; Ballantyne, 1945).

As observações de Ballantyne & Lowenstein apontando os

estudos anatomopatológicos como elucidativos da degeneração vascular diabética foram comprovadas (Ashton,1949).

Comparações anatomoclínicas entre as várias alterações encontradas na retina de pacientes diabéticos (microaneurismas, hemorragias, exsudatos, depósitos em paredes vasculares) foram feitas (Friedenwald,1948, 1950).

9. RETINOPATIA DIABÉTICA - ESTUDOS EXPERIMENTAIS

Estudos mostram que a avaliação dos vasos retinianos, de homens e de animais, para se conhecer a gênese das doenças vasculares é necessária (Hogan & Feeney,1963).

O conhecimento da ultra-estrutura retiniana, evidenciando detalhes que estavam fora do alcance da microscopia óptica, iniciou-se com Maeda (1959), que estudou vasos retinianos de olhos humanos normais.

Na década de 60, vários trabalhos foram desenvolvidos, descrevendo a ultra-estrutura da retina normal do ser humano e de animais (Kuwabara & Cogan, 1960; 1963; 1965; Kissen & Bloodworth, 1961; Ishikawa, 1963; Hogan & Feeney, 1963; Toussaint & Dustin, 1963).

Para o estudo experimental da RD, torna-se necessário o desenvolvimento da doença em animais que serão utilizados como modelos. Na história da pesquisa do DM, o DM experimental induzido cirurgicamente é usualmente associado aos nomes de Minkowski e Von Mering, com bases em investigações realizadas em 1889. Entretanto, DM temporário tinha sido induzido 200 anos antes por Johann Conrad Brunner (1653 - 1727), em cães (Keck, 1989).

Os estudos ultra-estruturais sobre RD em animais de experimentação iniciaram-se com o cão, na década de 60 (Engerman & Bloodworth, 1965; Bloodworth & Molitor, 1965; Bloodworth et al., 1969) e, depois com o rato, na década de 70 (Leuenberger et al., 1971; Babel & Leuenberger, 1974, Duhault et al., 1974).

Atualmente existem modelos em camundongos (Rodrigues, 1983), coelhos (Mac Gregor, 1986, de Juan, 1989; Takahashi, 1995) e macacos (Buchi, 1996).

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

-alimentação com sucrose originando ratos diabéticos (Engerman, 1976; Papachistodoulou, 1976);

-ratos com DM induzido por estreptozotocina

(Papachistodoulou, 1976; Robison, 1991);

-ratos BB Wistar com diabetes espontâneo (Sima, 1983);

-ratos diabéticos aloxânicos, modelo descoberto pelo professor Shaw Dunn e o aprendiz Mc Letchie (Mc Letchie, 1982; Kern, 1994; Schellini, 1992; Schellini, 1995);

-ratos alimentados com galactose (Robison, 1989 a; Kern, 1994);

-camundongos modificados por engenharia genética (Kern, 1996).

O enfoque para o mecanismo fisiopatogênico da RD nos estudos anatômicos é direcionado para os vasos retinianos (Robison, 1990; Schellini, 1992; Bazan, 1997; Ishibashi, 1999) e as demais camadas são menos valorizadas.

Entretanto, há estudos mostrando que não só os vasos apresentam alterações estruturais e ultra-estruturais na RD.

Em estudo a respeito da retinopatia diabética experimental (Schellini, 1992), 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.

Outro estudo mostrou que os fotorreceptores tornam-se separados da coróide, resultando em diminuição da acuidade visual, descolamento da retina e morte celular (Bazan, 1997).

Estudos anteriores mostraram que as células de Müller de retinas diabéticas apresentam alterações” (Hori, 1980; Schellini, 1995). 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 (Hori, 1980).

Em outro estudo, também sendo avaliadas as células de Müller, houve aumento da dispersão de cromatina, presença de granulações nucleares eletrodensas e aumento de glicogênio, corpos densos e lisossomas no citoplasma, principalmente nas células da região perivascular (Schellini, 1995).

Os motivos que justificam o presente estudo relacionam-se com a necessidade de estabelecer se existem alterações decorrentes do estado diabético, localizadas em outras camadas retinianas, no caso, a camada de fotorreceptores e a camada nuclear externa.

OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:

- Avaliar a estrutura e a ultra-estrutura da camada de cones e bastonetes e da camada nuclear externa de ratos normais de 4 meses e meio e 15 meses e meio de idade;
- Avaliar a estrutura e a ultra-estrutura da camada de cones e bastonetes e da camada nuclear externa de ratos diabéticos de 4 meses e meio e 15 meses e meio de idade.

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 avaliadas as camadas de cones e bastonetes, onde estão os segmentos externos e internos dos cones e bastonetes e a camada nuclear externa, onde estão os núcleos dos cones e bastonetes. O exame foi feito por sob de microscopia óptica e eletrônica de transmissão.

5. 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 histopatológico e do outro para exame ultraestrutural.

6. TÉCNICAS UTILIZADAS

6.1. 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 visualização 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.

6.2. 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".

6.3. 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.

6.4. 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 (Boëhringer Mannheim M.B. Bioquímica LTDA-RJ).

6.5. 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.

6.6 PREPARO DOS OLHOS PARA EXAME MORFOLÓGICO

6.6.1 Avaliação histopatológica

Após a enucleação, o olho direito foi preparado para avaliação estrutural, como segue:

- Secção escleral de cerca de 5 mm, nível do equador, usando-se bisturi com lâmina 15;
- Fixação em solução de Bouim alcoólico (Duboscq-Brasil) por 48 horas;
- Lavagem em série crescente de álcoois (70, 80, 90 e 100);
- Secção do globo com lâmina de barbear no sentido transversal;
- Remoção do cristalino com pinça delicada;

- Diafanização em benzoato de metila (24 horas) e benzol (45 minutos);

- Embebição em parafina histológica, em ponto de fusão de 58°C;

- Inclusão em bloco de parafina;

- Cortes histológicos, com espessura de 7 micra corados por hematoxilina-eosina e ácido periódico de Schiff (PAS).

Coloração com hematoxilina-eosina:

- desparafinização, com Xilol

- passar álcool absoluto

- passar água corrente e água destilada

- hematoxilina por 7 minutos

- passar diferenciador e água corrente

- passar álcool absoluto

- eosina 1 minuto

- passar álcool e xilol

- montagem

Coloração com PAS:

- desparafinização, hidratação com água destilada
- 15 minutos no ácido periódico
- 10 minutos lavar em água corrente
- 15 minutos no reativo de Schiff
- 10 minutos lavar em água corrente
- 30 segundos a 1 minuto na hematoxilina de Harris
- 5 minutos lavar em água corrente
- desidratar e montar

6.6.2. 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 .

6.6.3. Teste de Afzelius

Foi realizado o teste de Afzelius (teste para detecção de glicogênio) nos cortes histológicos ultra-finos. O teste de Afzelius foi realizado a partir da necessidade de identificação de grânulos observados no exame ultra-estrutural, sugestivos de serem portadores de conteúdo glicogênico, sendo realizado como segue:

- Recolhidos os cortes ultrafinos em telas de cobre;
- Incubação em solução de ácido tânico 1% em água destilada no escuro (60 minutos);

- Lavagem em água destilada (2x de 5 minutos);
- Tratamento com solução de acetato de uranila 4% em água destilada no escuro (90 minutos);
- Lavagem em água destilada (2x de 5 minutos);
- Observação ao microscópio eletrônico, sem contrastação.

6.7. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Foram obtidas, ao microscópio óptico e eletrônico de transmissão, micrografias das áreas de estudo.

A documentação fotográfica das lâminas histológicas foi feita com o filme Kodacolor Kodak. Para as eletromicrografias eletrônicas, foi utilizando o filme Ektacrome Kodak. O papel fotográfico utilizado foi o Kodacrome RC Print F3 Kodak.

6.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes aos parâmetros clínicos e bioquímicos obtidos no dia do sacrifício, foram submetidos a 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.

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 (Figuras 1 a 4).

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

2.2. Diurese

Comparando-se os valores da mediana de diurese dos animais do GC, assim como os do GD, observou-se não haver 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 semi-amplitude 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
	A	A
GD	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 A	27,93 ± 8,266 a A
GD	116,10 ± 31,56 b A	98,89 ± 21,69 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

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 M1, como em M2. (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
	A	A
GD	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	A
	514,33 ± 104,88 b	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
	A	A
GD	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. EXAME MORFOLÓGICO

4.1. MICROSCOPIA ÓPTICA

4.1.1. GC-M2 (Figura 5)

A camada de cones e bastonetes, assim como a nuclear externa, são facilmente distinguidas à microscopia óptica pela coloração dos seus constituintes.

O segmento externo (elipsóide) e o interno (mióide) dos cones e bastonetes foram observados na camada de cones e bastonetes como sendo uma "franja" suspensa e sem ligação anatômica com o epitélio pigmentar, podendo dele apresentarem-se próximos ou afastados.

O elipsóide apresentou coloração mais eosinofílica que o mióide.

Entre as camadas de cones e bastonetes e nuclear externa, observou-se uma linha eosinofílica, correspondente a Membrana limitante externa.

Os núcleos de cones e bastonetes são basofílicos e estão dispostos em pseudocamadas de número variável, cerca de 4 a 9, conforme o local de observação, sendo menor o número de camadas quando mais próximos da periferia retiniana, onde foram observadas de 4 a 5 e, na região central, de 7 a 9 camadas de núcleos.

Os núcleos dos cones são maiores que os dos bastonetes.

Entre os núcleos, estruturas filiformes de coloração eosinofílica foram observadas, ocorrendo em toda espessura da camada, correspondendo provavelmente a projeções citoplasmáticas das células de Müller.

4.1.2. GC-M3 (Figura 6)

Os animais do GC em M3 não diferiram em relação aos do GC em M2, quanto aos achados observados a microscopia óptica, exceto pelo encontro de depósitos eosinofílicos, localizados nos mióides.

4.1.3. GD-M2 (Figura 7)

Os animais do GD em M2 não diferiram em relação aos do GC em M2, quanto aos achados observados a microscopia óptica.

4.1.4. GD-M3 (Figura 8)

Os animais do GD em M3 apresentaram maior quantidade de glicogênio nos mióides do que o encontrado nos animais de GC em M3. Observou-se ainda, aumento no espaçamento entre os núcleos da camada nuclear externa.

4.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

4.2.1. GC-M2 (Figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20)

À microscopia eletrônica de transmissão, observou-se que os segmentos externo e interno dos bastonetes de ratos são mais estreitos e mais longos que os dos cones .

Verificou-se que os segmentos externos dos cones e bastonetes (CB) não possuem uniões com o epitélio pigmentar, estando justapostos aos ápices das células pigmentadas e rodeados pelas projeções citoplasmáticas do epitélio pigmentar.

Os elipsóides de CB são formados por “discos empilhados”, envoltos por membrana plasmática. O número de discos bem como a distância entre eles é maior nos bastonetes.

Os segmentos externo e interno estão ligados por meio de cílio conectante. A porção proximal do elipsóide é envolvida por expansões citoplasmáticas do mióide.

A porção distal do segmento interno possui maior concentração de mitocôndrias, que são alongadas, paralelas ao maior eixo da célula e dispostas próximo à membrana plasmática. A porção proximal, envolta por microvilos de células de Müller, é rica em ribossomos, microtúbulos e retículo endoplasmático rugoso.

No mióide, observou-se a presença de áreas arredondadas, envoltas por dupla membrana, contendo estruturas semelhantes a

fragmentos de cristas mitocondriais e formações ovóides eletrondensas, que receberam a denominação de "cistos". O teste de Afzelius revelou que o conteúdo dos "cistos" é glicogênio.

Nos animais do GC em M2, os "cistos" glicogênicos foram muito pouco freqüentes.

A Membrana limitante externa foi vista como constituída por uniões celulares tipo desmosomos, "ligando" porções citoplasmáticas das células de Müller até os mióides e núcleos dos cones e bastonetes.

Na camada nuclear externa, os núcleos dos cones e bastonetes foram vistos como estruturas muito eletrondensas, com formato oval, redondo ou trapezóide, bem próximos uns dos outros e possuindo pequena quantidade de citoplasma ao redor.

O que mais chama atenção nestas células é a disposição da cromatina, condensada principalmente na área central do núcleo. Em alguns núcleos observou-se nucléolo. Em núcleos menores, a cromatina esteve descondensada.

O citoplasma dos cones e bastonetes é bastante escasso, limitando-se a circundar o núcleo como uma estreita faixa, principalmente nos locais onde há maior densidade de núcleos. Nas regiões onde há maior

quantidade de citoplasma, foi possível observar mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático liso e rugoso e escassos lisossomos.

Próximo à camada de cones e bastonetes, assim como próximo à camada plexiforme externa, foram vistos os prolongamentos citoplasmáticos e axônios ricos em neurotúbulos e vesículas citoplasmáticas, estendendo-se a partir do citoplasma celular.

Os espaços entre os corpos celulares são preenchidos pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Müller, sendo possível observar organelas citoplasmáticas dentro destes prolongamentos.

Os núcleos de cones e bastonetes foram encontrados muito próximos uns dos outros, não havendo espaços vazios entre eles, exceto como observação isolada em alguns cortes.

4.2.2. GC-M3 (Figuras 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28)

Nos animais do GC em M3, no que diz respeito à morfologia celular (tamanho, espaçamento entre as células, bem como entre os segmentos interno e externo; número, forma e localização das organelas citoplasmáticas), observou-se as mesmas características do encontrado no GC em M2, com exceção da presença dos “cistos” glicogênicos que foram encontrados mais amiúde (cerca de 1 “cisto” por campo examinado). “Figuras de Mielina” e corpos densos foram raramente observados. Os

núcleos de cones e bastonetes também não apresentaram alterações neste grupo em relação ao GC em M2.

4.2.3.GD-M2 (Figuras 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38)

Os segmentos externo e interno dos CB do GD em M2 apresentaram-se mais espaçados entre si, quando comparados aos do GC em M2. No segmento interno, foi constatado o aumento de corpos densos, lisossomos e vacúolos intracitoplasmáticos. As mitocôndrias apresentaram-se edemaciadas, tendendo ao formato mais oval ou redondo e com diminuição no número de cristas. Foram observados vacúolos, de vários tamanhos, geralmente apresentando conteúdo eletrtransparente e “figuras de Mielina”.

No segmento interno, com maior frequência, foram observados os "cistos" contendo grânulos de glicogênio, envoltos por halo transparente e "pseudomembrana", assim como a presença de corpos densos.

Na camada nuclear externa, comparando-se com o GC, observou-se dispersão de cromatina em vários núcleos, assim como a presença de núcleos picnóticos. Observou-se, ainda, aumento do conteúdo citoplasmático ao redor do núcleo. Organelas como corpos densos e lisossomos foram mais freqüentemente observados no citoplasma dos

fotorreceptores e nos prolongamentos citoplasmáticos das células de Müller nos animais deste grupo.

4.2.4. GD-M3 (Figuras 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48)

As alterações observadas foram semelhantes e mais acentuadas que nos animais do GD em M2.

Observou-se espaço entre os segmentos interno e externo em alguns locais da camada e os corpos densos e “figuras de Mielina” foram observados com maior frequência.

No segmento interno desses animais, observou-se com bastante frequência os “cistos” glicogênicos, por vezes mais do que um dentro de um mesmo fotorreceptor. Os “cistos” glicogênicos foram observados mais frequentemente nos bastonetes do que nos cones. Alguns segmentos de cones e bastonetes apresentaram maior eletrondensidade citoplasmática.

A camada nuclear dos cones e bastonetes dos animais do GD em M3 apresentou as mesmas alterações citoplasmáticas e nucleares que no grupo GD em M2, em maior intensidade na comparação. Nas regiões em que o citoplasma apresentou-se mais abundante, nos prolongamentos citoplasmáticos dos cones e bastonetes, foi possível observar “cistos” glicogênicos e corpos densos.

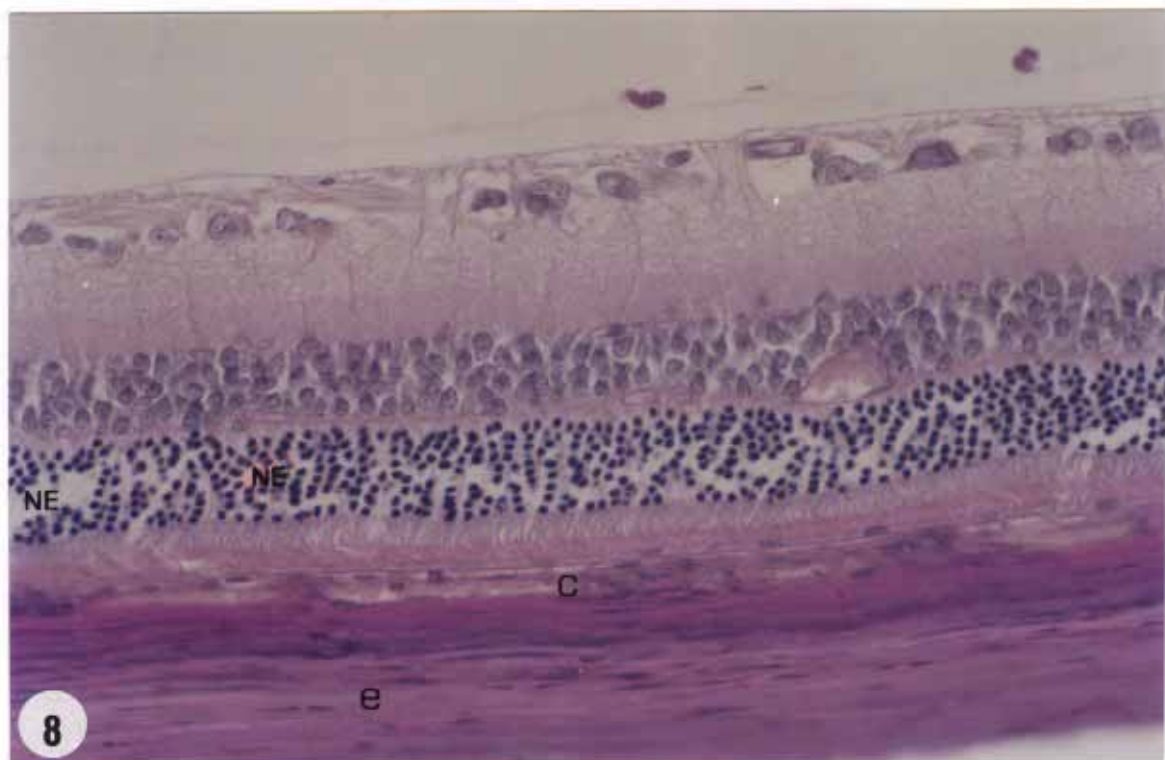
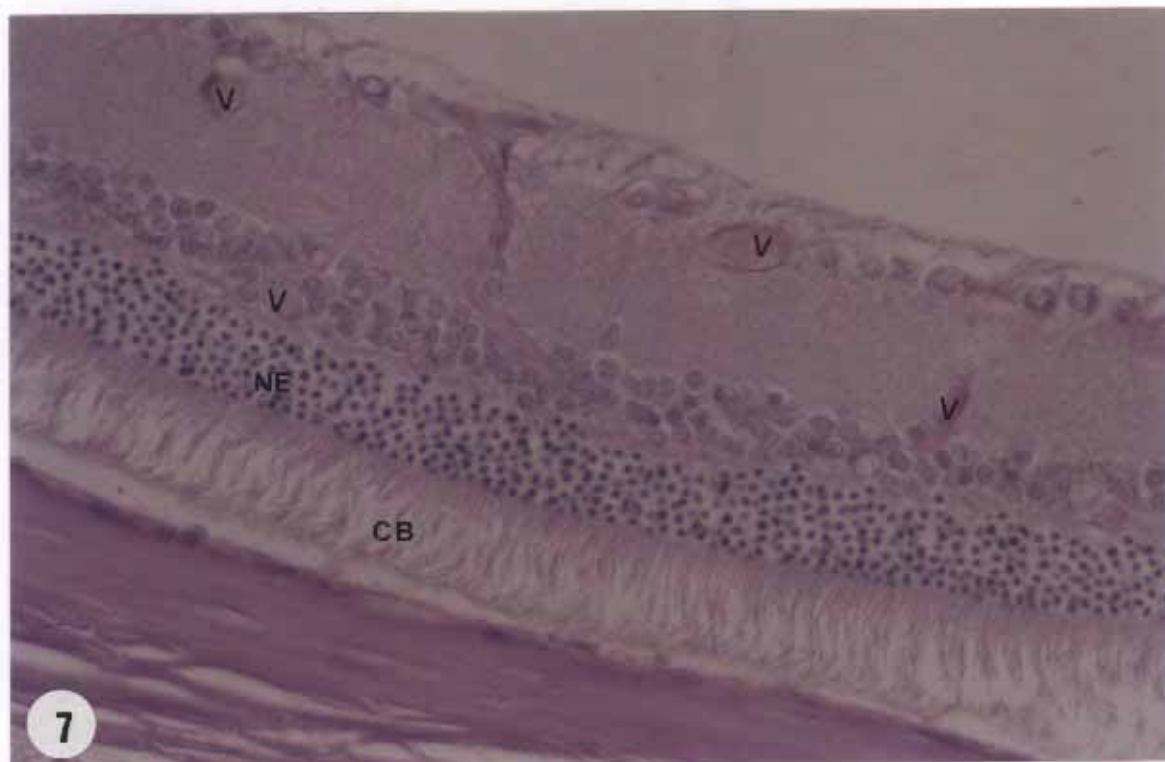


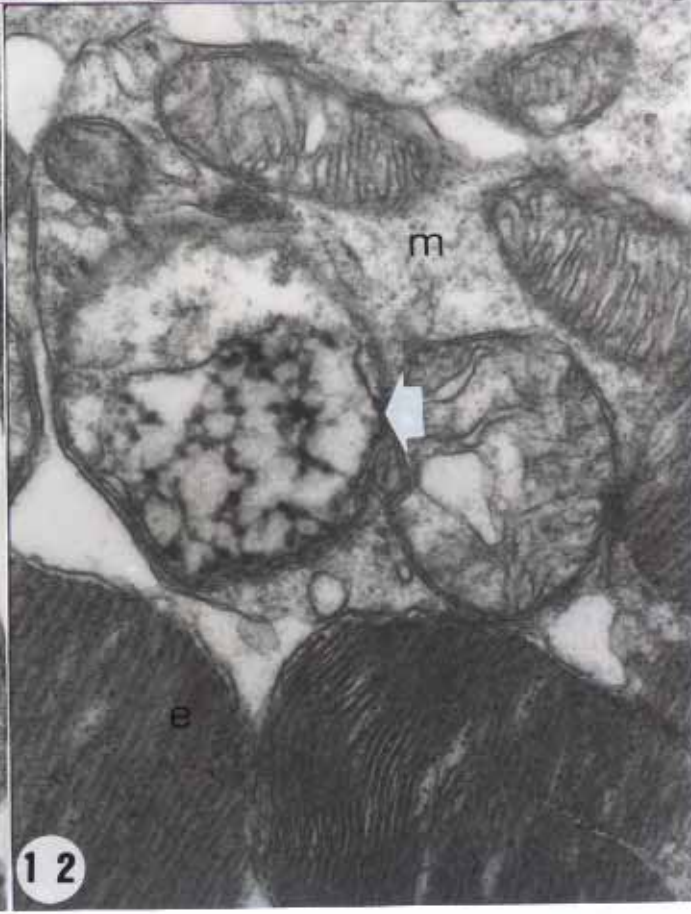
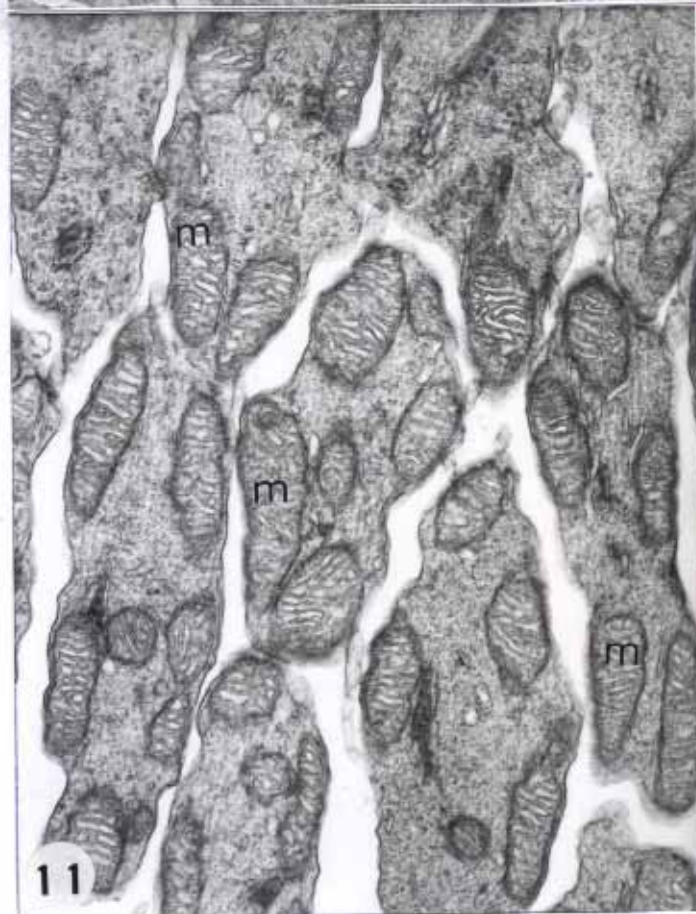
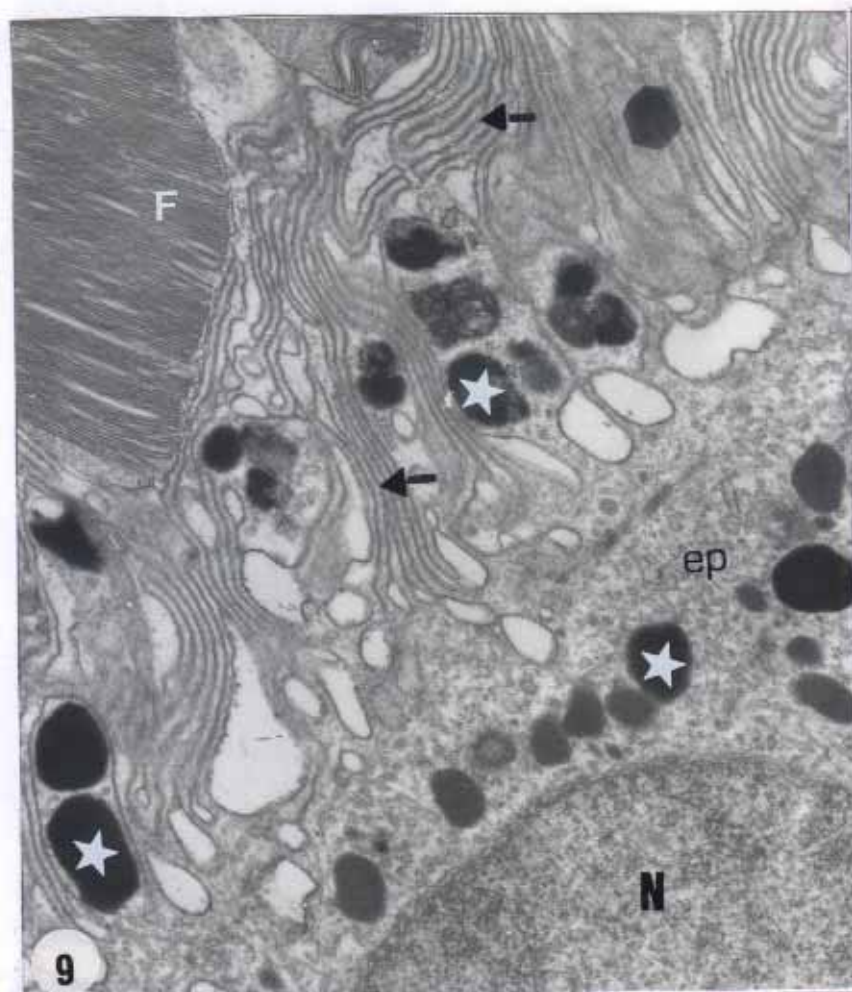
GD - M2

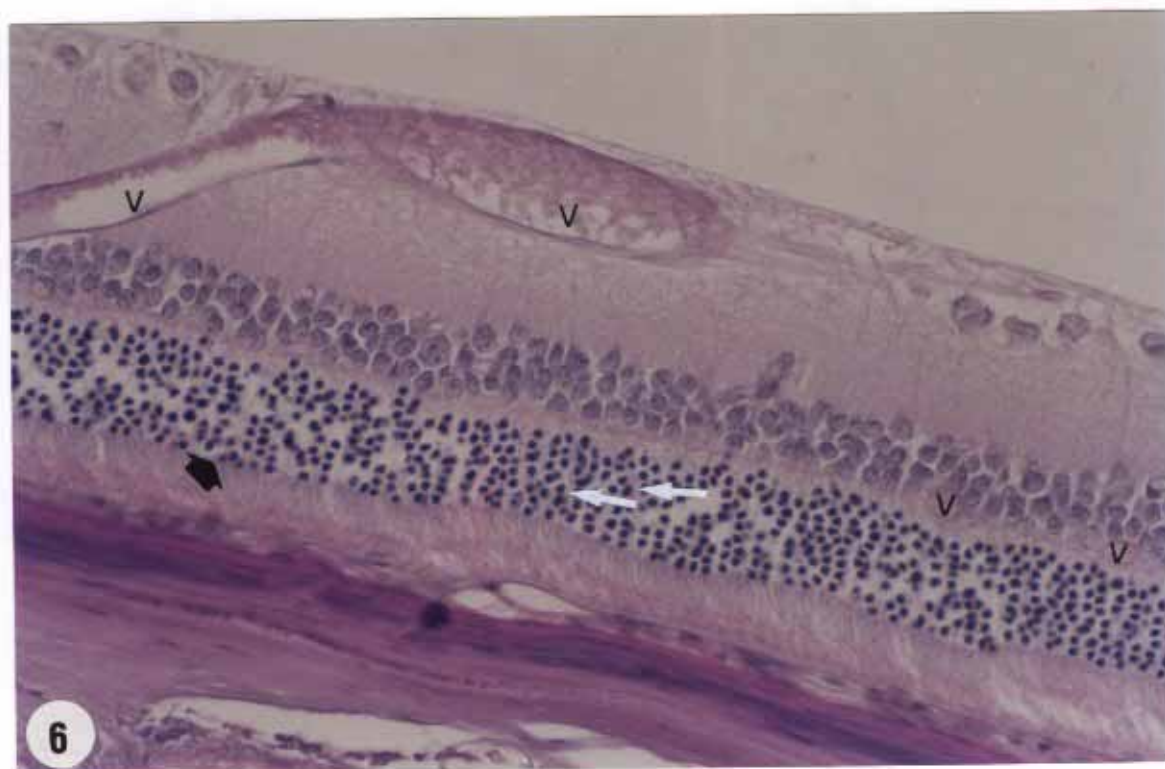
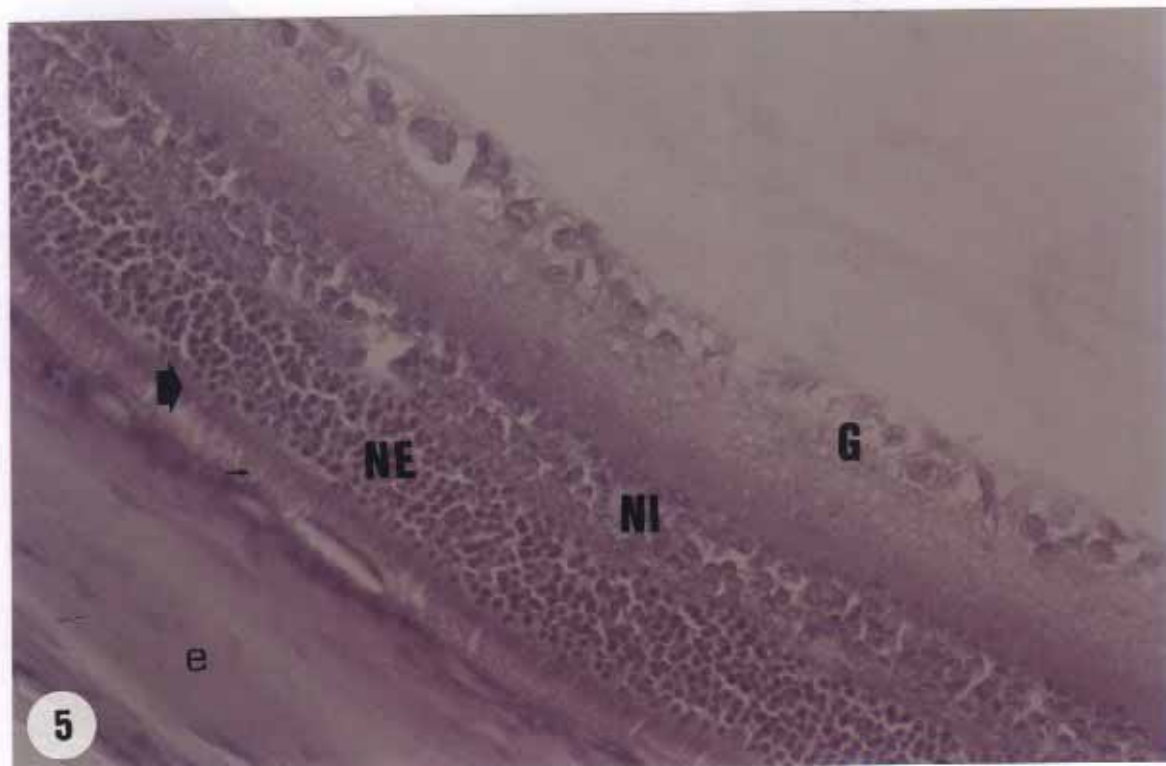
3

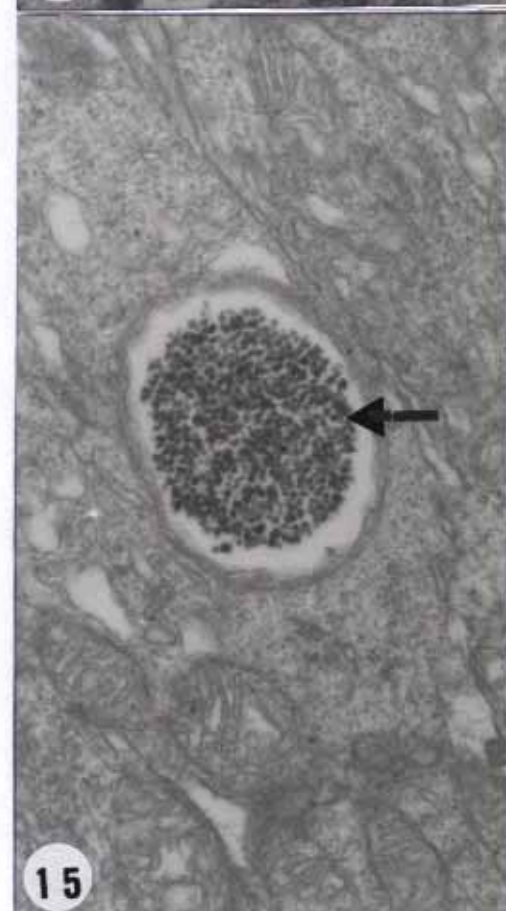
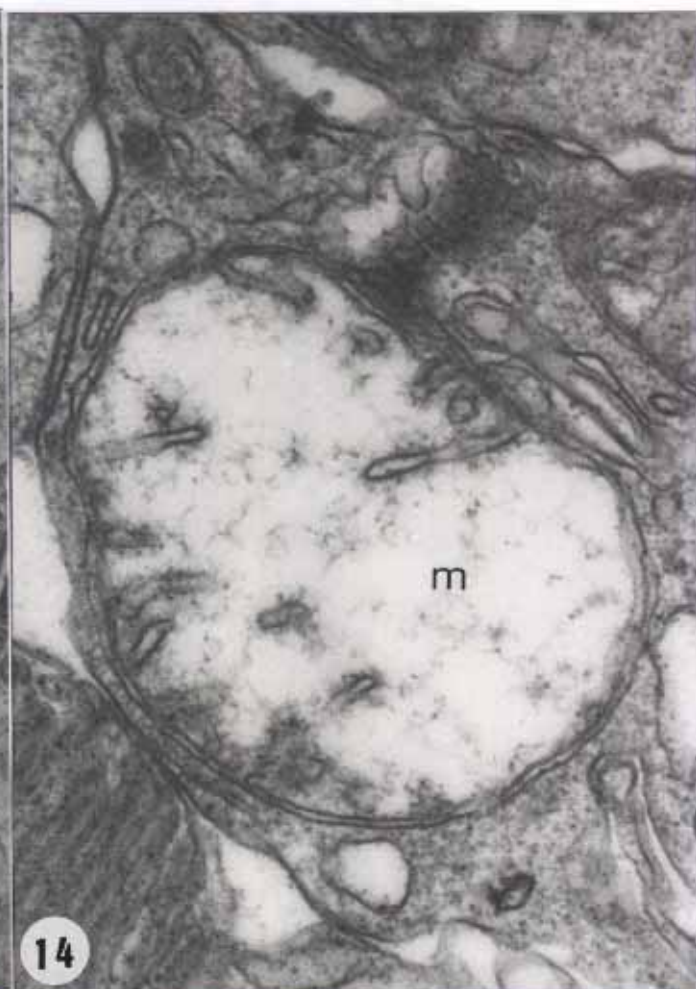
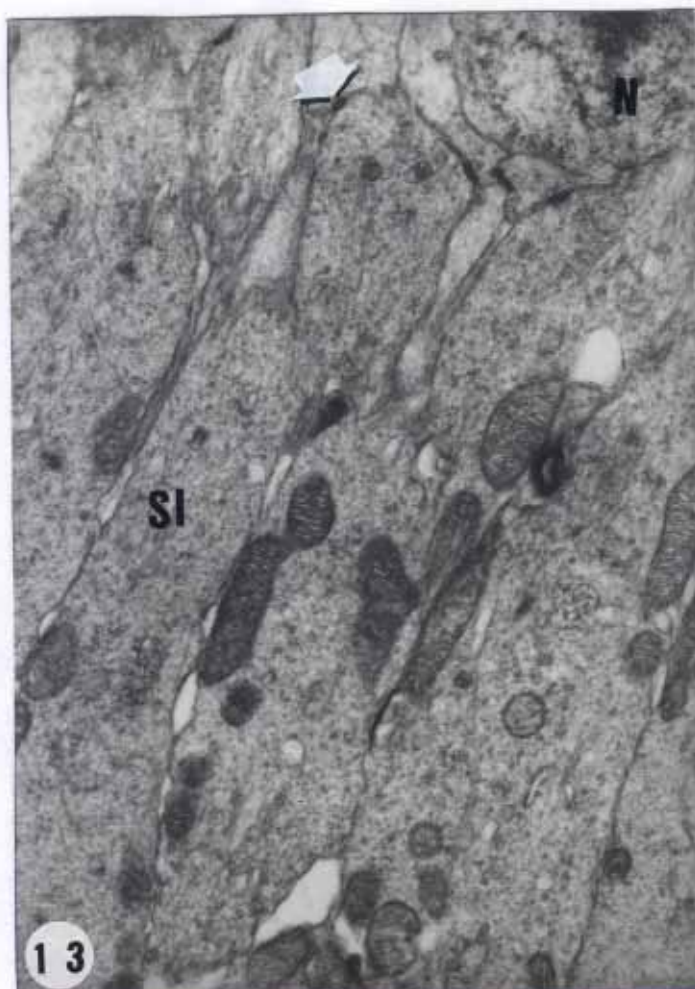
GD - M3

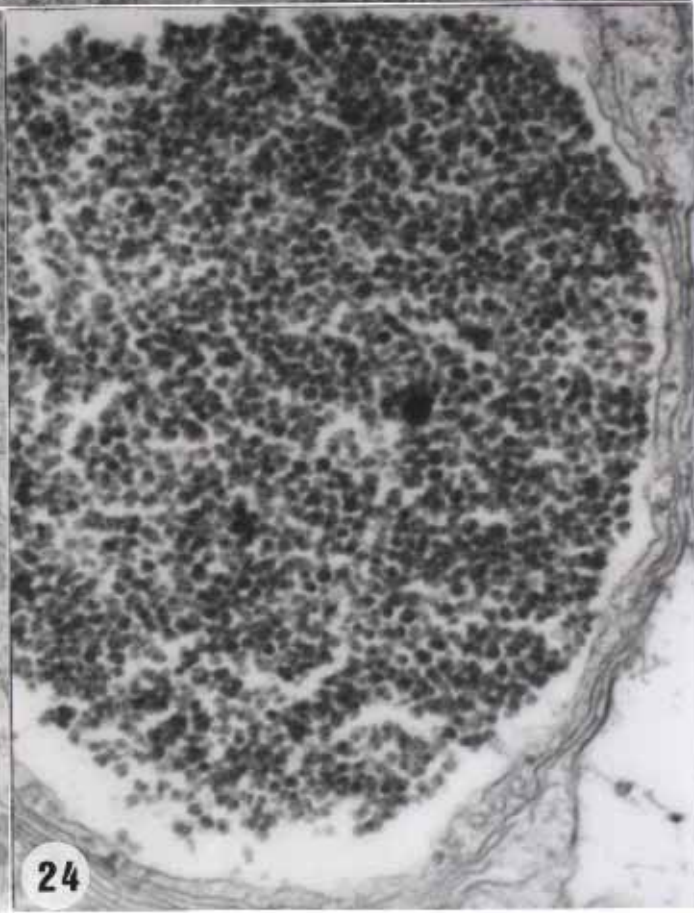
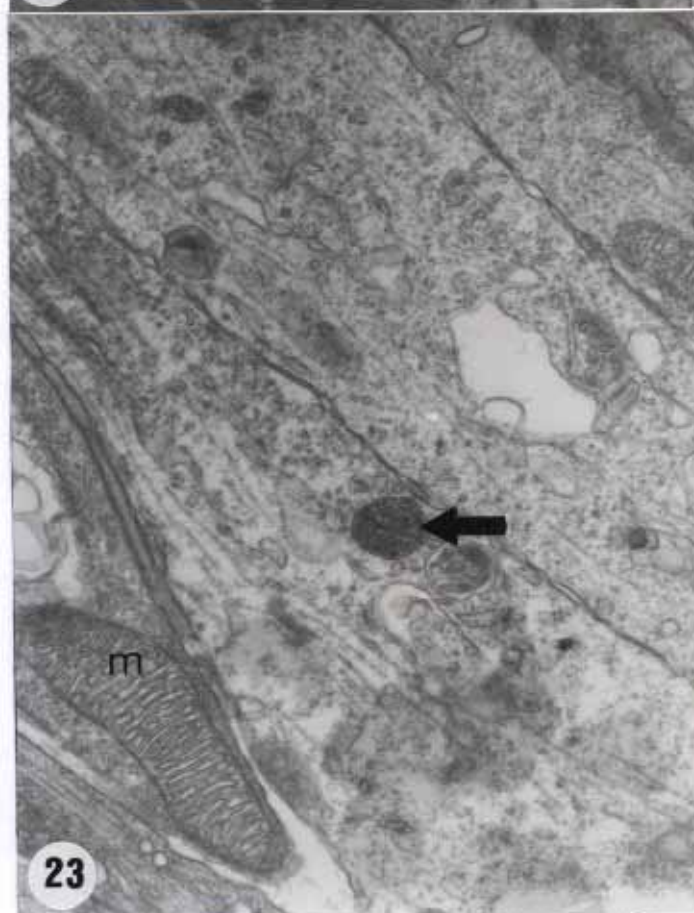
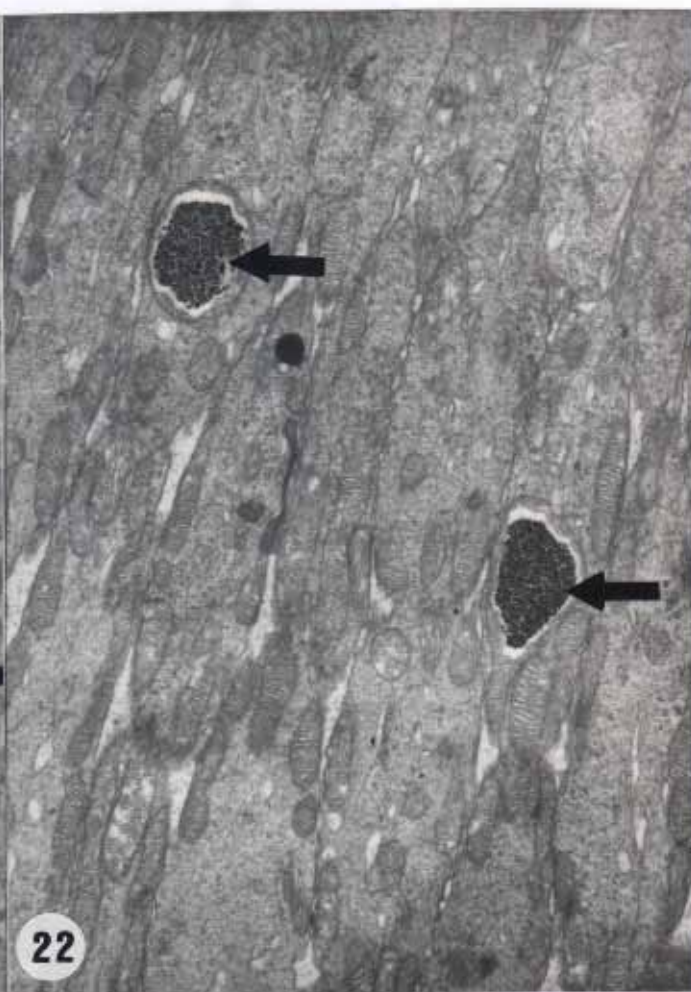
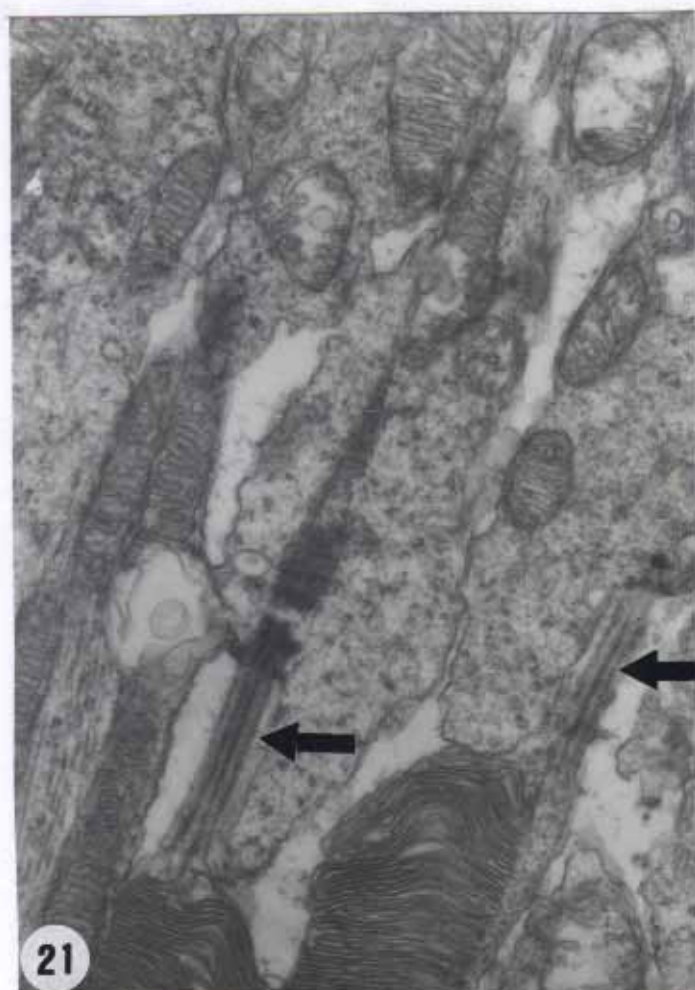
4

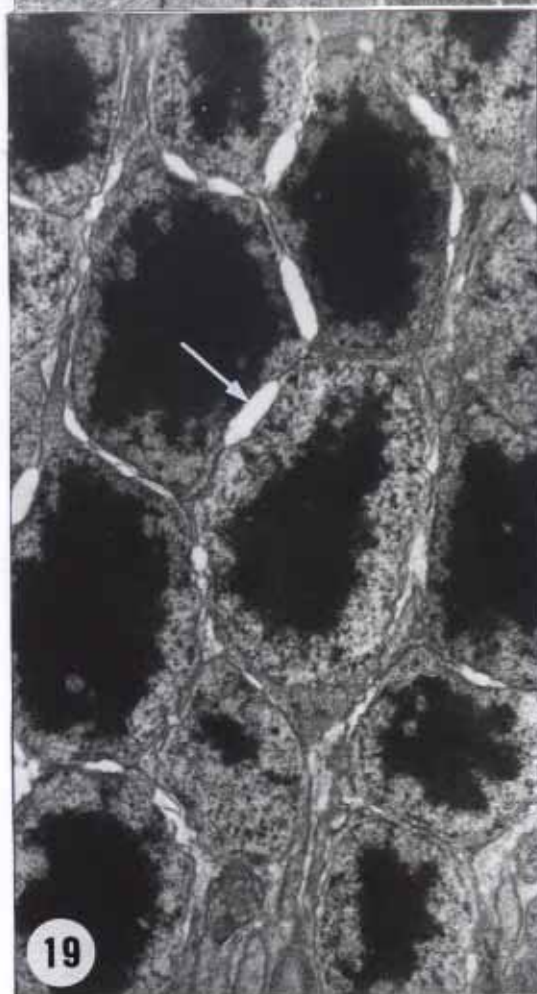
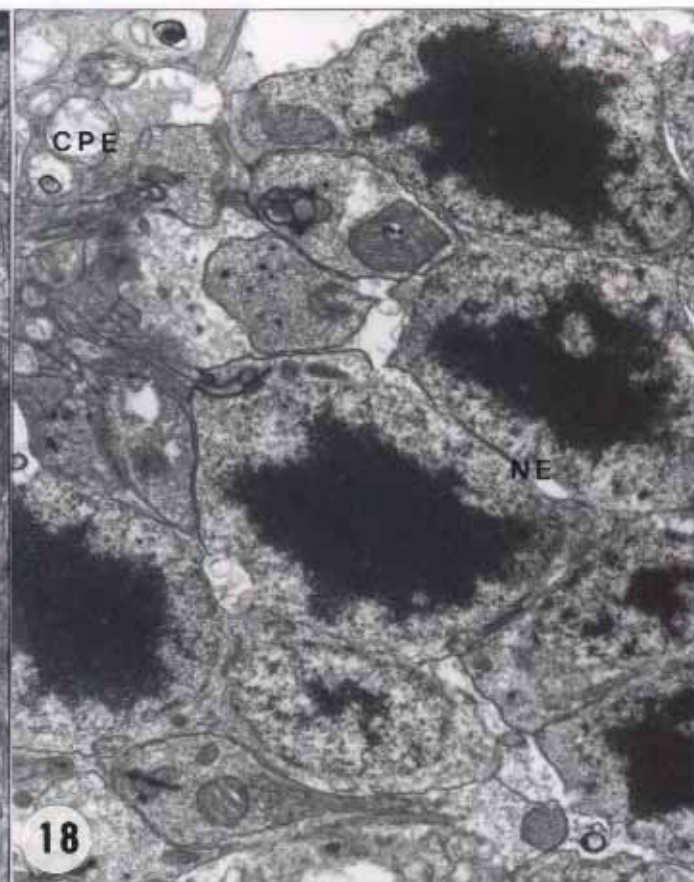
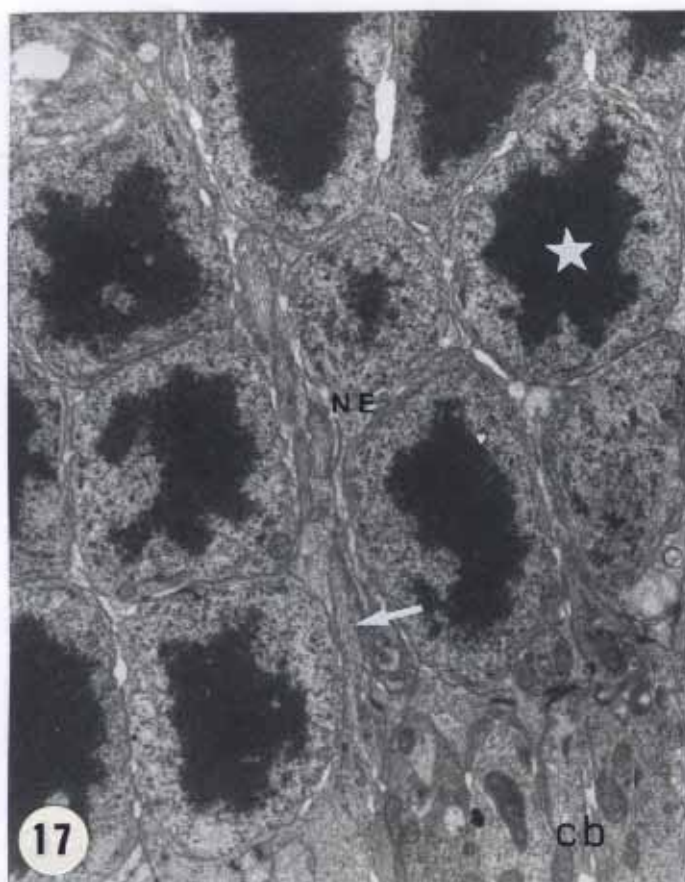


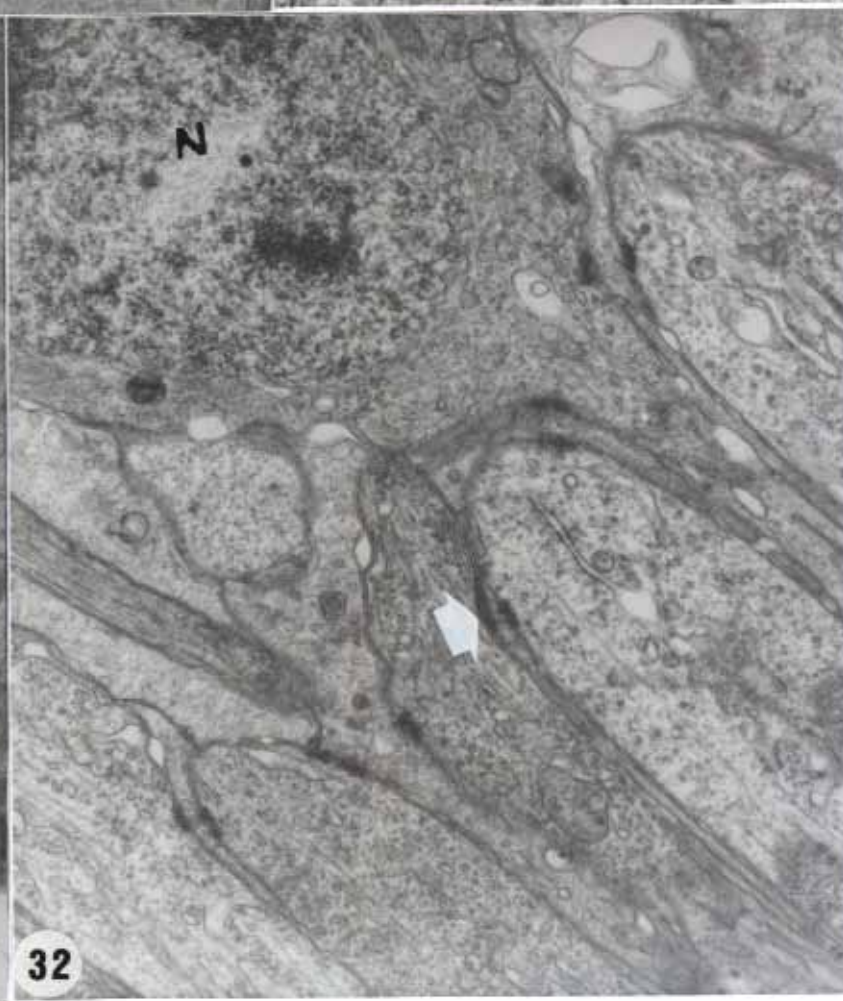
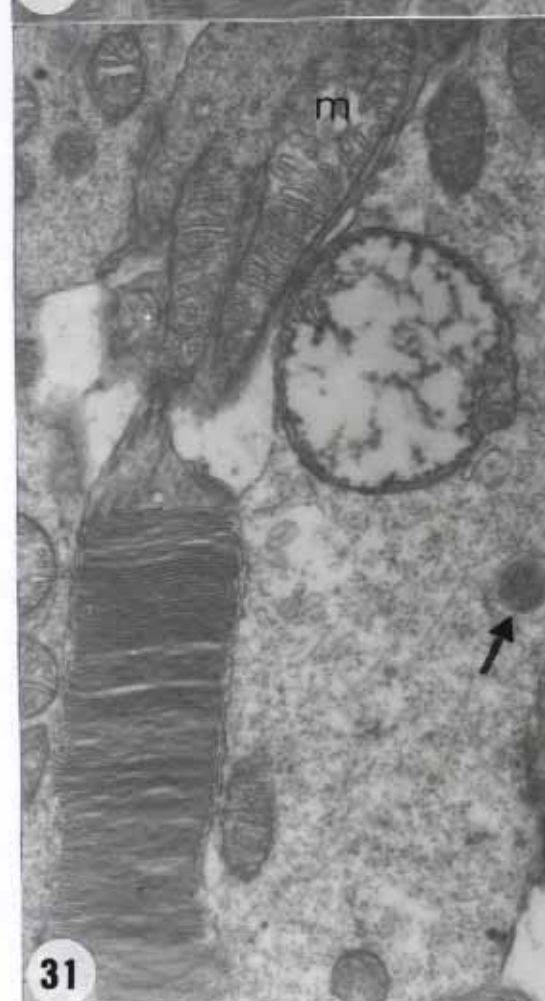
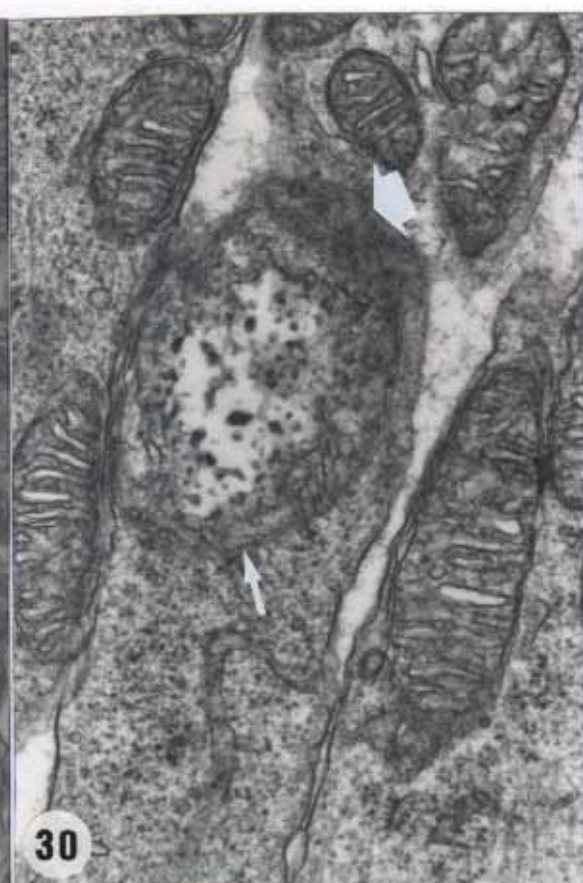
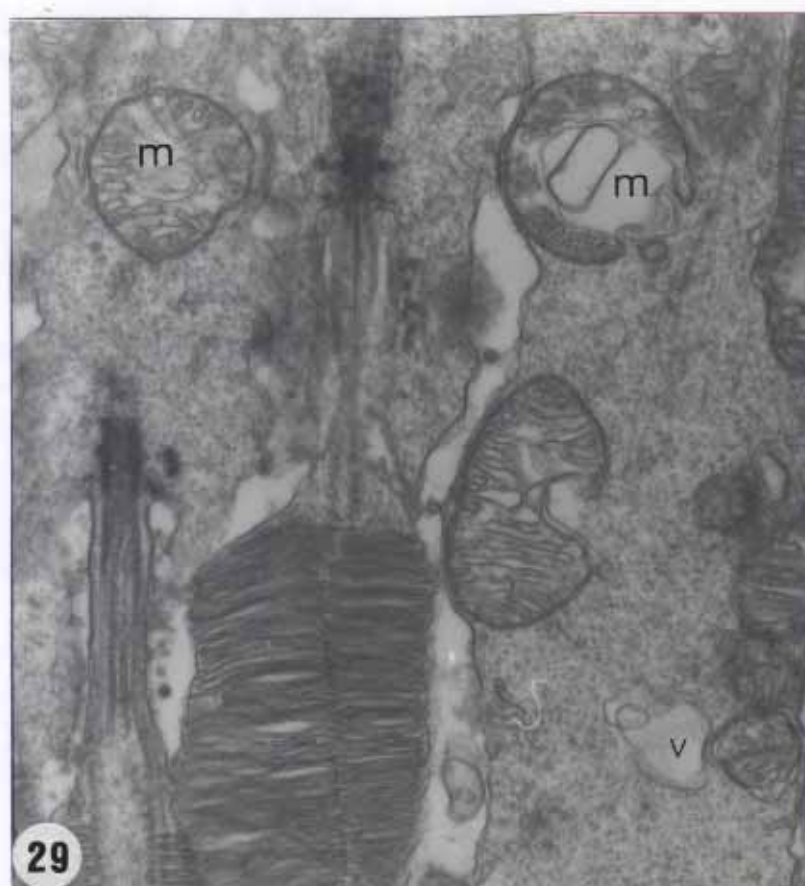


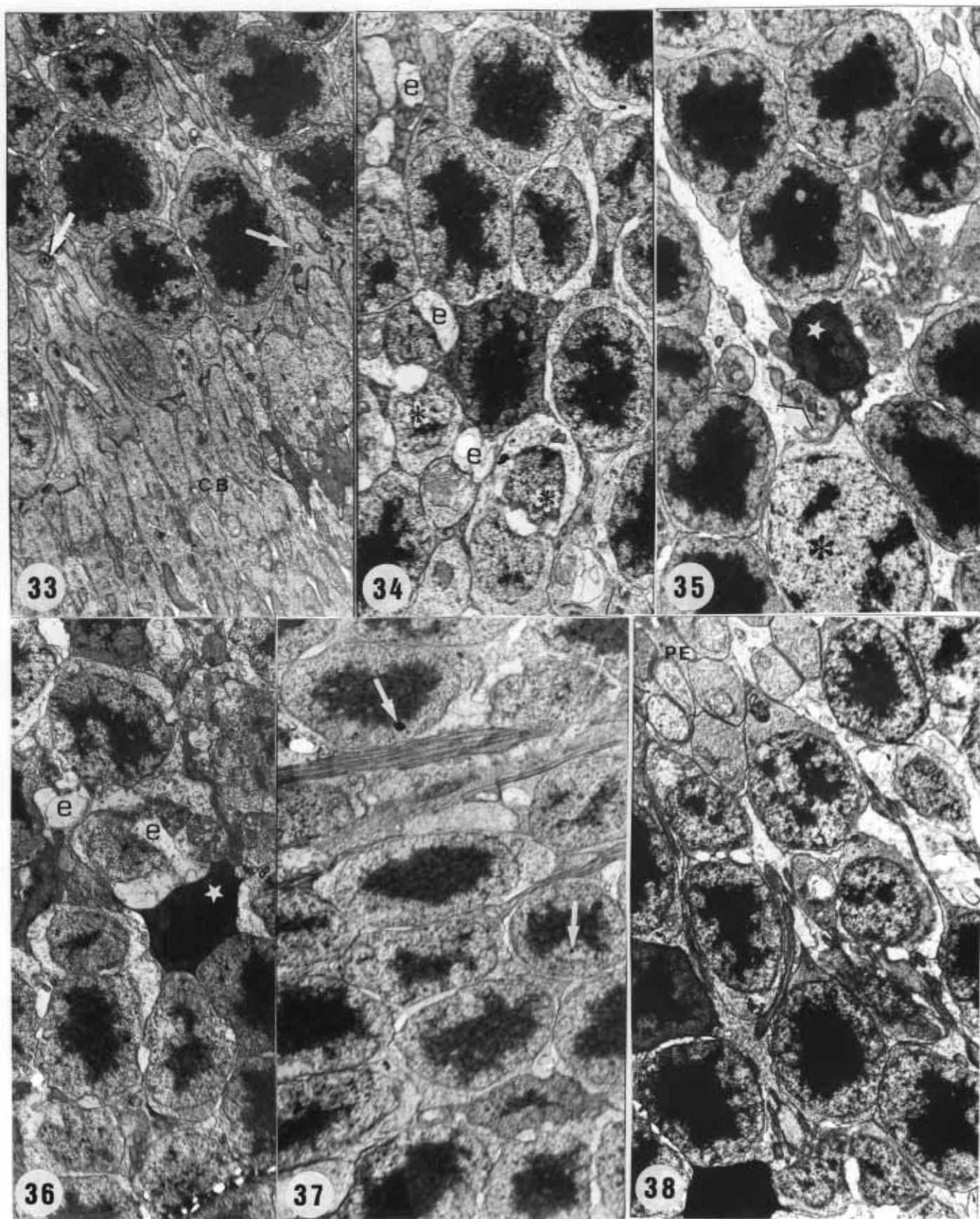


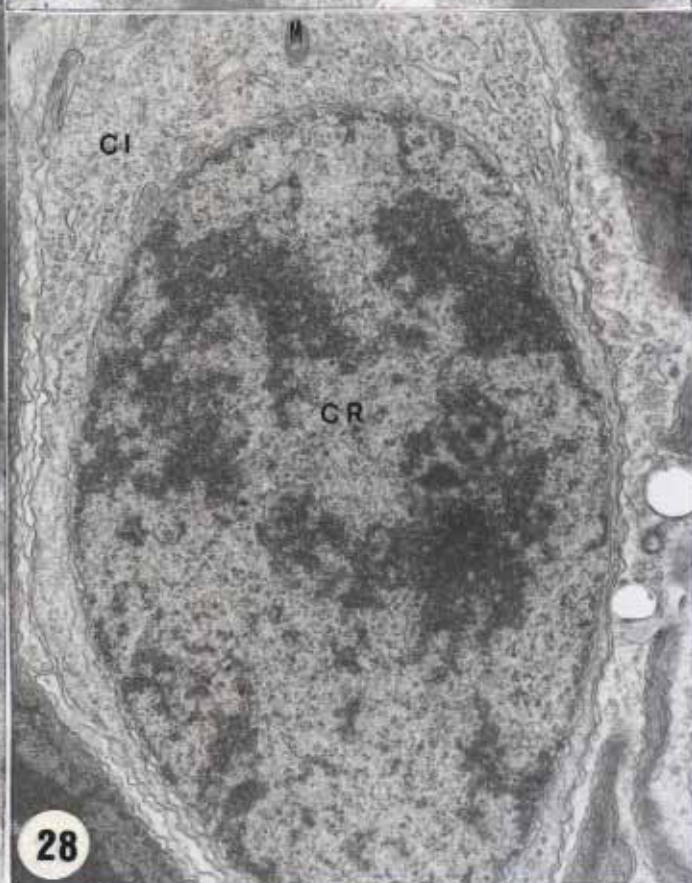
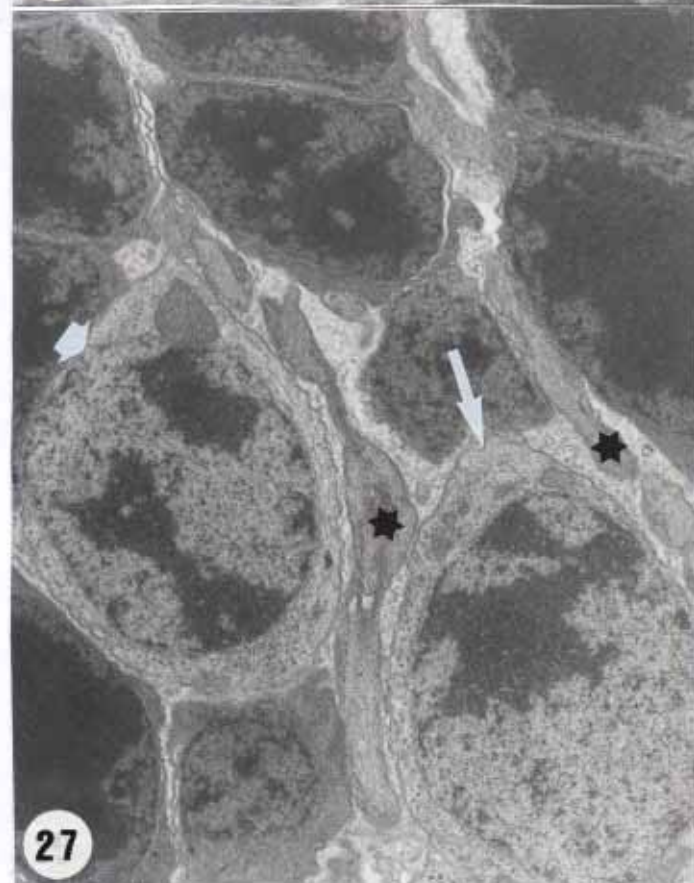
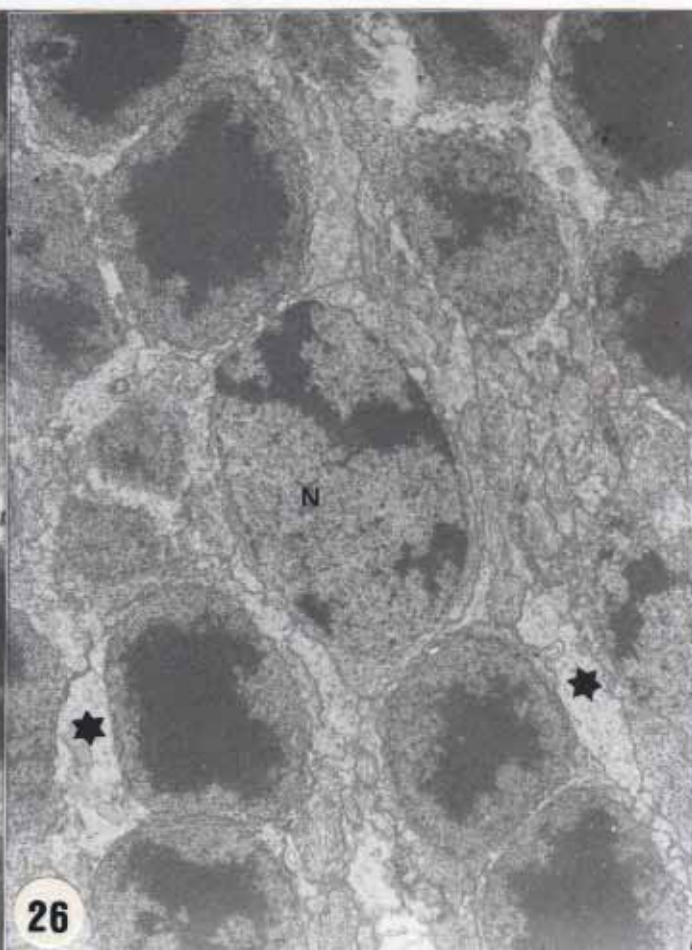
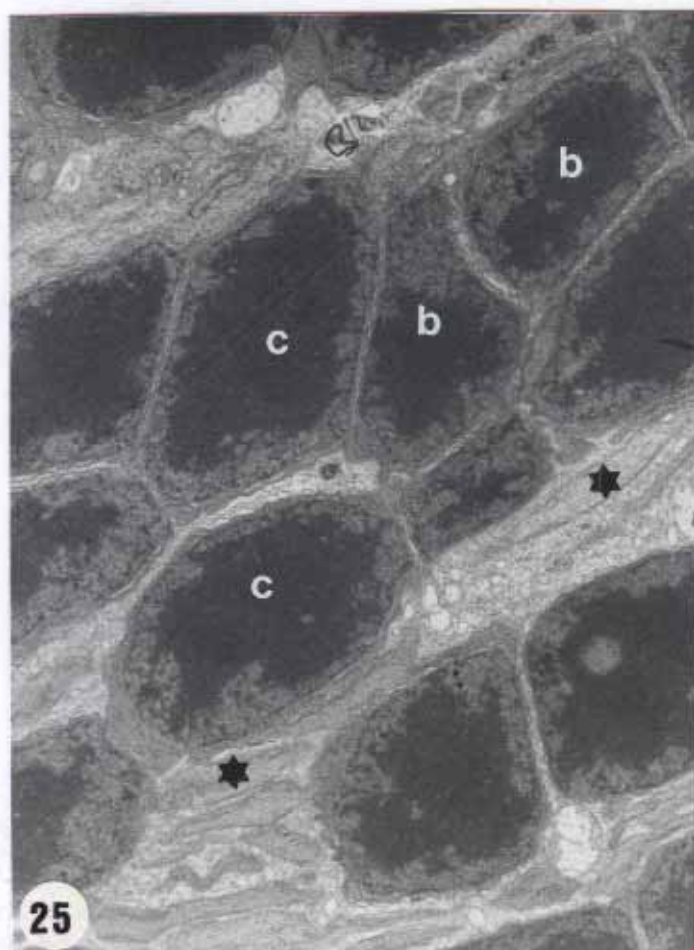


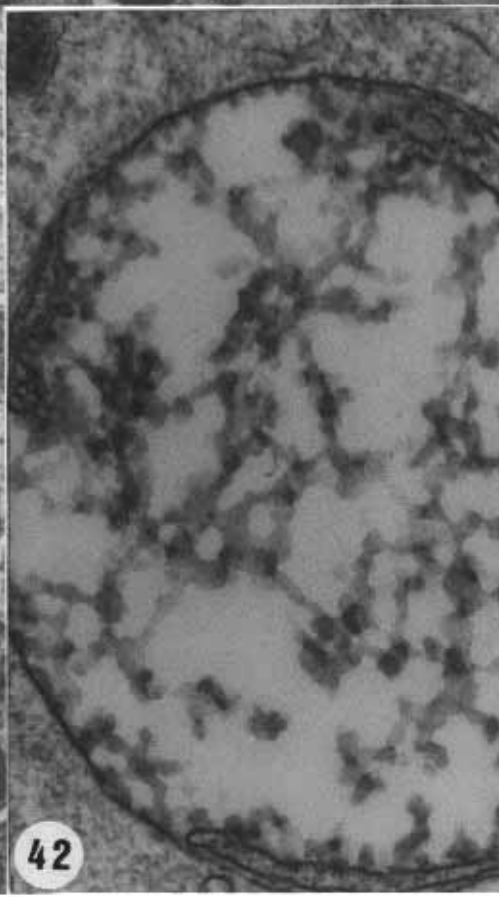
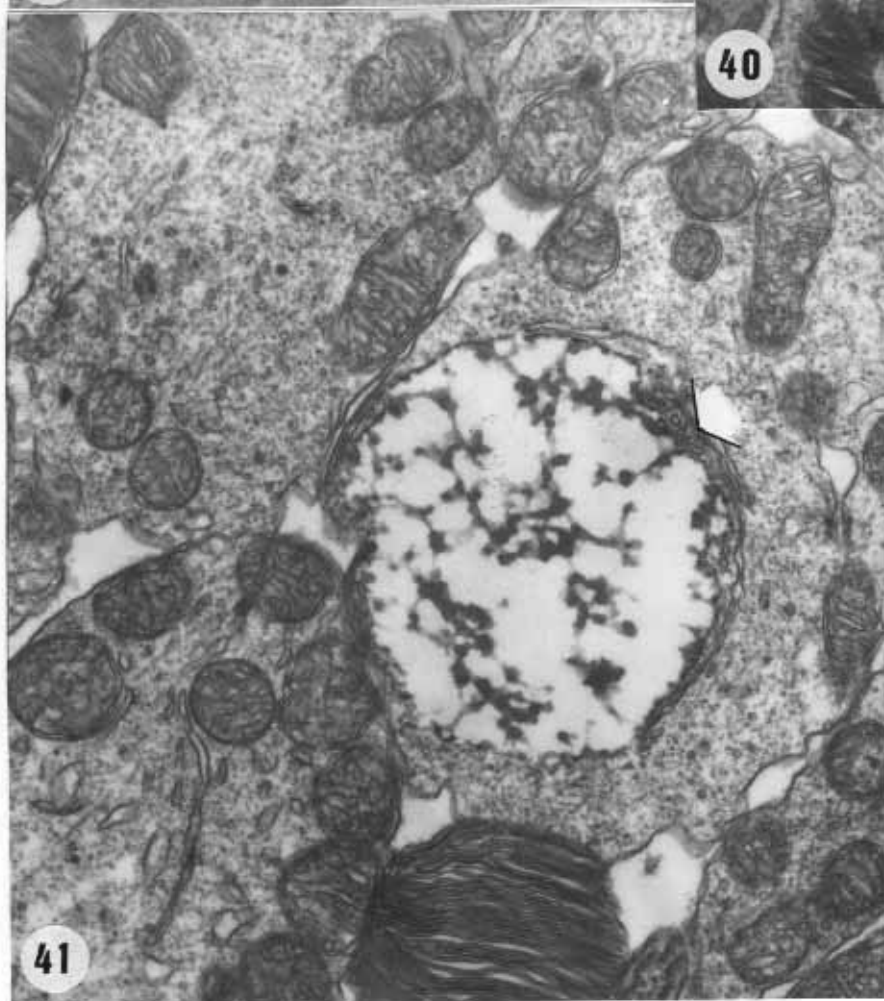
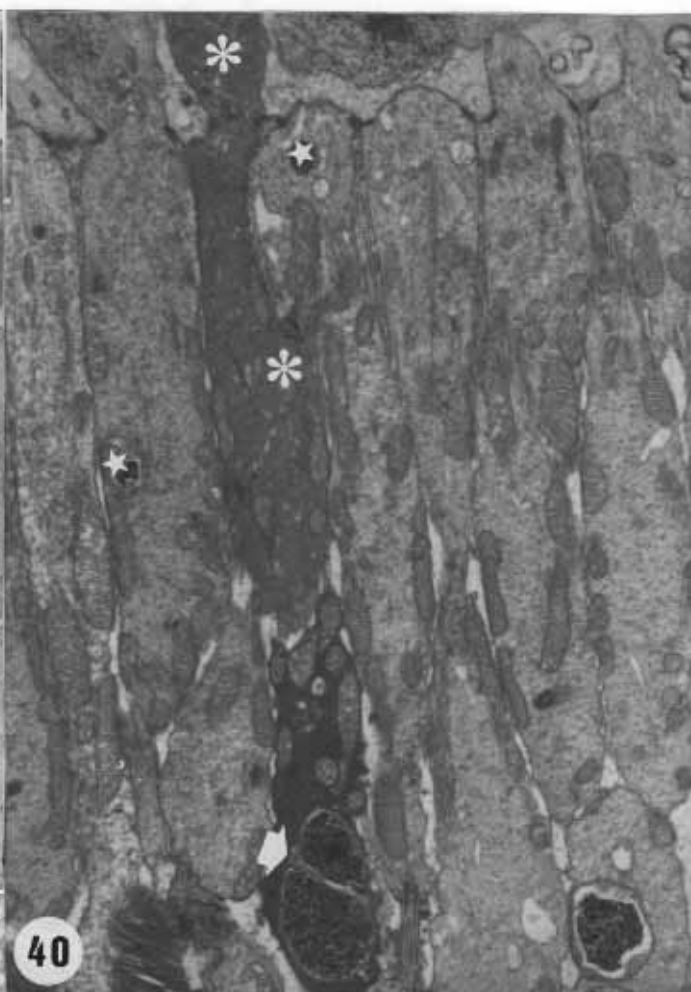
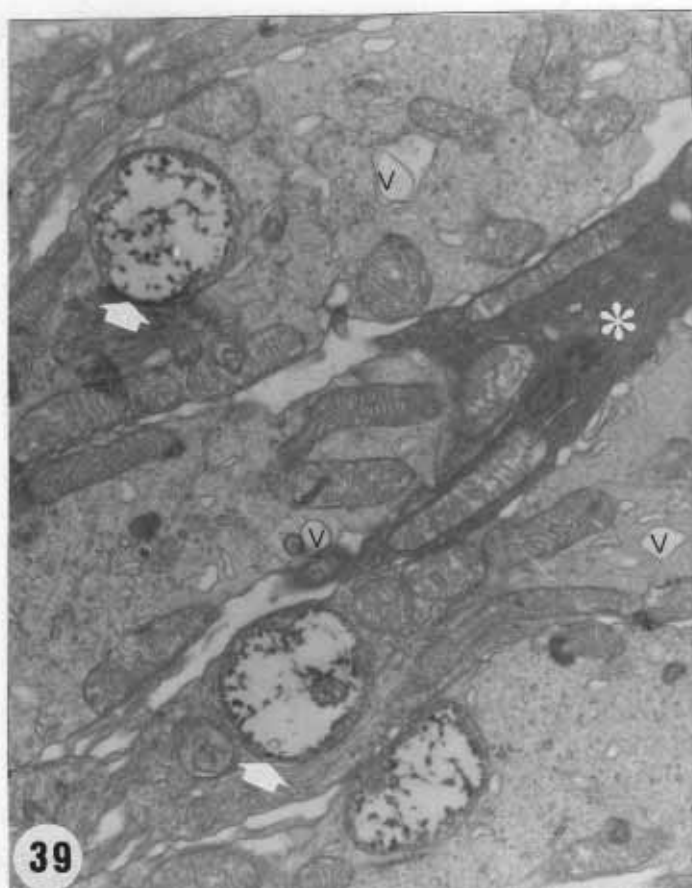


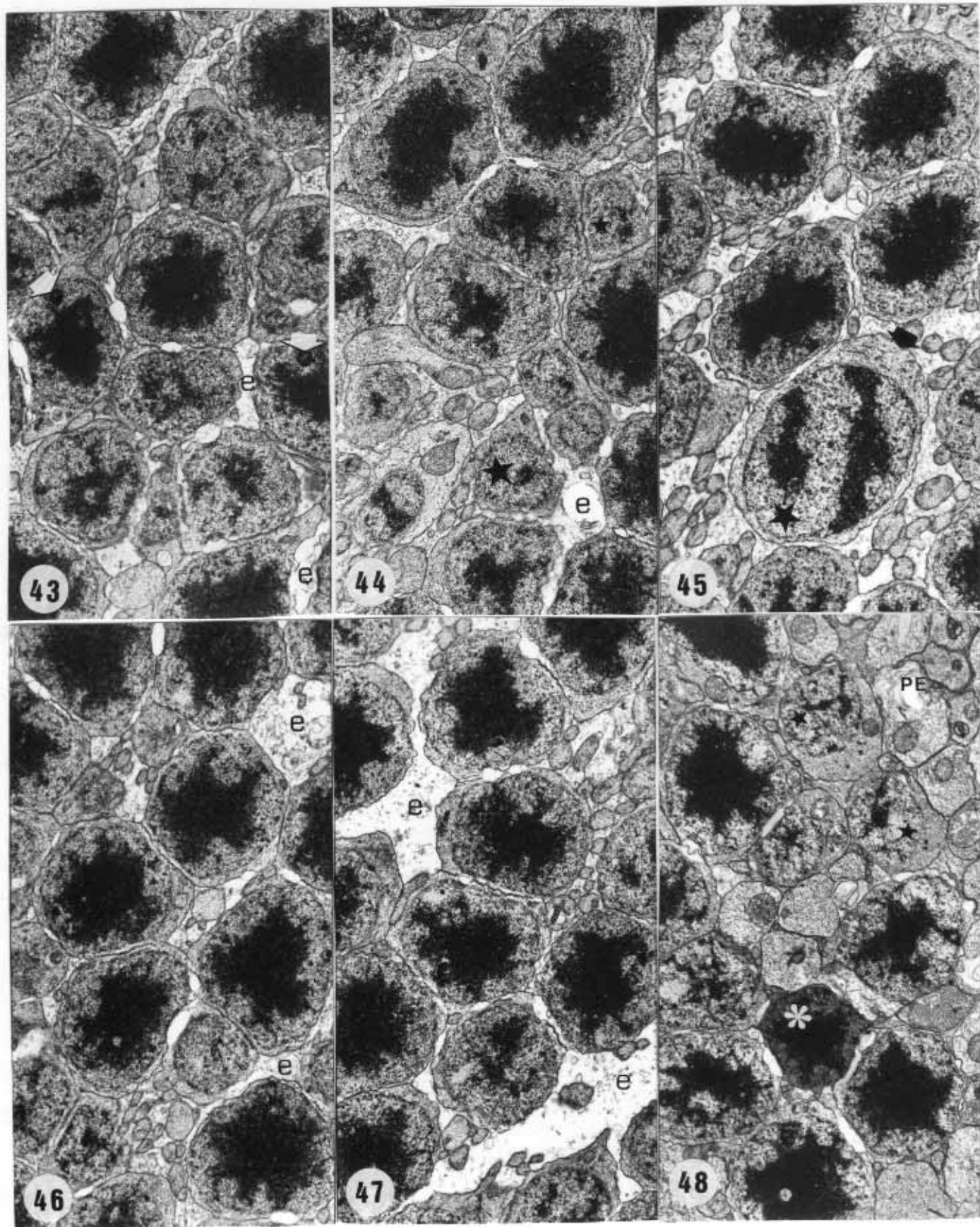












LEGENDA DAS FIGURAS

FIGURA 5 - GC M2

Fotomicrografia das camadas retinianas, além de porção da esclera (e). Na camada de cones e bastonetes observa-se o elipsóide (seta fina) e mióide (seta grossa); notar a distinção de coloração entre eles. Camada nuclear externa (NE) com núcleos dispostos em pseudocamadas de número variável, entremeados por estruturas filiformes. Distintas ainda a camada nuclear interna (NI) e camada de células ganglionares (G) (HE-40X).

FIGURA 6 – GC M3

Fotomicrografia das camadas retinianas. Destaque para os depósitos eosinofílicos (vistos como minúsculos pontos róseos) nos mióides. Presença de projeções de células de Muller entre os núcleos dos cones e bastonetes (seta branca). Membrana limitante externa observada como linha eosinofílica (seta branca). Vasos (V) na camada plexiforme externa, camada de células ganglionares e camada plexiforme interna (PAS-40X).

LEGENDA DAS FIGURAS

FIGURA 7 - GD M2

Fotomicrografia das camadas retinianas. Camada de cones e bastonetes (CB), camada nuclear externa (NE). Distribuição dos vasos (V), observados nas camadas mais internas da retina (HE-40X).

FIGURA 8 - GD M3

A quantidade de depósitos eosinofílicos nos mióides aumentou em relação ao GC M3. Observar espaçamento entre núcleos na camada nuclear externa (NE). Esclera (e). Coróide (c) (PAS-40X).

LEGENDA DAS FIGURAS

FIGURA 9 - GC M2

Eletronmicrografia mostrando a relação entre epitélio pigmentar (ep) e os fotorreceptores (F). Projeções citoplasmáticas das células do epitélio pigmentar (seta). Núcleo (N). Corps densos (☆) (21000X).

FIGURA 10 - GC M2

Discos empilhados de fotorreceptor envoltos por membrana plasmática (57500X).

FIGURA 11 - GC M2

Segmentos internos de fotorreceptores envoltos por tecido citoplasmático, contendo mitocôndrias (m) alongadas dispostas próximo à membrana plasmática. Observar riqueza de ribossomos e retículo endoplasmático no citosol (21000X).

FIGURA 12 - GC M2

“Cisto” glicogênico (seta) no mióide (m). Elipsóide (e) (42000X).

LEGENDA DAS FIGURAS

FIGURA 13 - GC M2

Segmento interno (SI) de fotorreceptores na região próxima à Membrana limitante externa (seta). Núcleo de fotorreceptor (N) (16500X).

FIGURA 14 - GC M2

Mitocôndria (m) edemaciada e com destruição das cristas no segmento interno (77500X).

FIGURA 15 - GC M2

Destaque para o “cisto” glicogênico (seta); observar que o mesmo é envolto por dupla membrana. Citoplasma (c) ao redor, com organelas (27000X).

FIGURA 16 - GC M2

Transição entre camada de cones e bastonetes e camada nuclear externa. Membrana limitante externa (seta) formada pelas uniões entre fotorreceptores e prolongamentos citoplasmáticos das células de Müller (M). Núcleos de fotorreceptores (N) (21000X).

LEGENDA DAS FIGURAS

FIGURA 17 - GC M2

Transição entre camada de cones e bastonetes (cb) e camada nuclear externa (NE). A característica dos núcleos é a disposição da cromatina concentrada na região central (☆). O citoplasma ao redor dos núcleos é escasso, assim como os espaços internucleares. Prolongamentos citoplasmáticos (seta) (7250X).

FIGURA 18 - GC M2

Transição entre camada nuclear externa (NE) e camada plexiforme externa (CPE) (7250X).

FIGURA 19 - GC M2

Núcleos justapostos com pequenos espaços intercelulares (seta) (7250X).

FIGURA 20 - GC M2

Detalhe de núcleo de cone (C). Observar a fina faixa de conteúdo citoplasmático ao redor do núcleo (seta). Prolongamento citoplasmático com organelas (★). Núcleo de bastonete (B) (14500X).

LEGENDA DAS FIGURAS

FIGURA 21 - GC M3

Cílios conectantes em destaque entre elipsóide e mióide (seta) (21000X).

FIGURA 22 - GC M3

Presença de “cistos” glicogênicos em fotorreceptores (13000X).

FIGURA 23 - GC M3

Mitocôndrias (m). Corpo denso com estruturas multivesiculares (21000X).

FIGURA 24 - GC M3

Detalhe do “cisto” glicogênico, onde se observa o envoltório em dupla membrana (65000X).

LEGENDA DAS FIGURAS

FIGURA 25 - GC M3

Núcleos de cones (c) e bastonetes (b) envoltos por pequena quantidade de citoplasma. Observar a disposição de cromatina condensada no centro do núcleo (CR) e a ausência de espaços intercelulares. Axônios e prolongamentos das células de Müller presentes entre os núcleos (★) (7250X).

FIGURA 26 - GC M3

Espaços intercelulares alargados (★). Núcleos com dispersão de cromatina (N) (7250X).

FIGURA 27 - GC M3

Axônios e prolongamentos das células de Müller presentes entre os núcleos (★). Dispersão da cromatina e aumento da quantidade de citoplasma ao redor de alguns núcleos (seta) (7250X).

FIGURA 28 - GC M3

Detalhe de célula contendo núcleo com acentuada dispersão de cromatina (CR) e com aumento do citoplasma (CI) ao redor do núcleo, contendo ribossomos, retículo endoplasmático e mitocôndrias (M) (14500X).

LEGENDA DAS FIGURAS

FIGURA 29 - GD M2

Fotorreceptores contendo mitocôndrias (m) edemaciadas e vacúolos (v) de conteúdo eletrtransparente (27000X).

FIGURA 30 - GD M2

“Cisto” glicogênico iniciando-se dentro de mitocôndria (36000X).

FIGURA 31 - GD M2

Mitocôndrias (m) edemaciadas. “Cisto” glicogênico e corpos densos (21000X).

FIGURA 32 - GD M2

Membrana limitante externa (seta). Núcleo (N) com dispersão de cromatina (21000X).

LEGENDA DAS FIGURAS

FIGURA 33 - GD M2

Região de transição entre a camada de cones e bastonetes (CB) e camada nuclear externa. Os núcleos mostram condensação central da cromatina. Nos prolongamentos citoplasmáticos são observados corpos densos (seta) (3000X).

FIGURA 34 - GD M2

Observar espaçamento entre os núcleos (e) e núcleos com dispersão de cromatina (*****) (3000X).

FIGURA 35 - GD M2

Presença de núcleo picnótico (**☆**) e outro com dispersão da cromatina (*****) (3000X).

FIGURA 36 - GD M2

Espaçamento entre os núcleos (e). Núcleo picnótico (**☆**) (3000X).

FIGURA 37 - GD M2

Presença de nucléolo (seta) em alguns núcleos (3000X).

FIGURA 38 - GD M2

Núcleos na região de transição com a camada plexiforme externa (PE) com alterações na distribuição da cromatina (3000X).

LEGENDA DAS FIGURAS

FIGURA 39 - GD M3

Eletrondensidade aumentada (*) em mióide e vários “cistos” glicogênicos (seta). Vacúolos (v) (16500X).

FIGURA 40 - GD M3

Mióide e citoplasma (*) da camada nuclear externa. Vários “cistos” glicogênicos (seta), assim como corpos densos (☆) (13000X).

FIGURA 41 - GD M3

Edema de mitocôndrias e “cisto” de glicogênio. Observar na face lateral (seta) do “cisto” glicogênico, estrutura semelhante à crista mitocondrial (27000X).

FIGURA 42 - GD M3

Detalhe do “cisto” glicogênico (80000X).

LEGENDA DAS FIGURAS

FIGURA 43 - GD M3

Espaçamento entre núcleos (e). Nucléolo (seta).
Dispersão da cromatina (3000X).

FIGURA 44 - GD M3

Observar espaçamento entre os núcleos (e) e alguns núcleos com dispersão acentuada de cromatina (★) (3000X).

FIGURA 45 - GD M3

Aumento da quantidade de citoplasma ao redor do núcleo (seta) com dispersão da cromatina (★) (3000X).

FIGURA 46 - GD M3

Espaçamento irregular entre os núcleos (e) (3000X).

FIGURA 47 - GD M3

Espaçamento irregular entre os núcleos (e), ainda mais acentuado (3000X).

FIGURA 48 - GD M3

Transição com a camada plexiforme externa (PE), mostrando núcleos com várias alterações. Núcleo picnótico (★). Dispersão de cromatina (★) (3000X).

DISCUSSÃO

Quanto ao modelo experimental utilizado

Um grande problema encontrado no estudo experimental da retinopatia diabética tem sido a escolha do modelo animal adequado, que reproduza lesões oculares semelhantes às encontradas no homem.

Dos vários animais utilizados como modelo experimental, alguns desenvolvem o diabetes espontaneamente, como o rato BB, o cão Keeshond, a macaca Nigra e algumas raças de hamsters e de camundongos (Mordes & Rossini, 1981). Esses animais, em geral, vivem em colônias e não estão disponíveis em nosso meio.

Os cães desenvolvem lesões morfolologicamente idênticas às humanas, inclusive neovascularização intra-retiniana (Frank, 1989). Apesar disto, demoram cerca de 5 anos para começar a manifestar as alterações retinianas, elevando muito o tempo e, conseqüentemente, o custo do experimento (Tilton et al., 1986).

Os macacos, que apresentam grande semelhança com a retina humana, seriam teoricamente os melhores modelos experimentais para o estudo do diabetes; porém, pesquisas com macacos Rhesus, acompanhados por 10 anos, não mostraram lesões significativas além de alguns microaneurismas (Gibbs et al., 1969; Bresnick et al., 1976).

O rato ocupa um importante lugar na pesquisa médica. Entre as variedades mais comuns em laboratórios experimentais estão a Wistar, a Sprague-Dawley e a Long-Evans. O rato Wistar, utilizado no presente experimento, possui cabeça maior e cauda mais curta comparado às outras variedades e presta-se bem à pesquisa experimental ocular (Harkness & Wagner, 1993), apesar de não desenvolver todas as lesões retinianas encontradas no diabetes humano (Heath, 1970; Engerman et al., 1982; Tilton et al., 1986). No entanto, parece ser um bom modelo animal para o estudo do diabetes, em decorrência das seguintes vantagens:

- Fácil manuseio (alimentação, higiene e acomodação);
- Ciclo biológico curto, o que permite obtenção de alterações crônicas e degenerativas em pouco tempo;
- Ocupa pouco espaço, possibilitando o trabalho simultâneo com vários grupos experimentais;
- Apresenta alterações retinianas do diabetes com pouco tempo de indução;
- A maioria dos estudos sobre retinopatia diabética utiliza o rato como animal de experimentação.

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 a Orloff

(1975). Desde 1986, foi formado um grupo de estudos preliminar nesta instituição, para estudo dos efeitos do diabetes sobre o organismo como um todo.

Assim, todos os parâmetros para indução e controle do estado diabético já estão muito bem estabelecidos, o que facilita os estudos.

Tempo de seguimento

A observação dos animais foi feita em três períodos diferentes. A primeira observação (M1) se deu com 15 dias após a indução do diabetes pela aloxana, período necessário para confirmação do quadro de diabetes grave (Spadella, 1989; Schellini, 1992).

A segunda observação foi em M2, onde os ratos dos grupos GC e GD foram sacrificados, 1 mês após a confirmação do quadro de diabetes grave, com o intuito de analisar as alterações iniciais do diabetes na camada de cones e bastonetes. Caldwell et al. (1987) encontraram alterações na retina 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 (Schellini, 1992; Machado, 1993).

Por outro lado, a expectativa de vida do rato é de 3 anos ou menos e quando eles se tornam diabéticos fica difícil mantê-los vivos por mais de um ano e meio (Frank, 1989).

Indução do diabetes experimental

O diabetes experimental pode ser provocado pelo uso de agentes beta-citotóxicos (Rakieten et al., 1963), exposição ao ACTH ou à hidrocortisona (Lazarus & Bencosme, 1955), por estresse, pancreatectomia, infecções, toxinas (Mordes & Rossini, 1981), lesões no sistema nervoso central, uso de hormônios antiinsulínicos e indução por vírus (Yoon et al., 1979).

Dentre esses métodos, os que produzem diabetes por indução química têm sido empregados com maior frequência para o estudo da retinopatia diabética. A indução química, apesar de acompanhar-se de alto índice de mortalidade, tem a vantagem de ser de fácil execução, de permitir a utilização de grande número de animais e de ser seletiva, preservando assim a função exócrina do pâncreas.

As drogas mais utilizadas para esse fim são a aloxana e a estreptozotocina, que têm efeito tóxico sobre as células beta-pancreáticas, causando insuficiência insulínica permanente (Mordes & Rossini, 1985). A aloxana 2% apresenta um custo inferior ao da streptozotocina, um dos

motivos pelos quais foi utilizada neste estudo.

A aloxana é um derivado do ácido úrico e encontra-se, em geral, na forma de mono-hidrato de aloxana. Foi descoberta por Dunn et al. (1943) que, durante estudo sobre os efeitos do ácido úrico em rins de coelhos, observaram que a aloxana causava destruição das células beta-pancreáticas. Embora a evidência predominante seja de que a aloxana cause diabetes por efeito tóxico direto sobre as células beta, o local e o mecanismo exato da sua ação não são completamente conhecidos (Bell & Hye, 1983).

Supõe-se que a aloxana atue no sítio de transporte do açúcar para o interior da célula. Sua ação diabetogênica, porém, é bloqueada pelo pré-tratamento com açúcares que compartilhem o mesmo mecanismo de transporte da membrana plasmática (Kass & Waisbren, 1945).

Segundo Bell & Hye (1983), a aloxana agiria também sobre o sítio responsável pela liberação de insulina na célula beta, que é diferente do sítio de transporte de glicose. Ainda não se sabe ao certo se esta interação da aloxana com alguns sítios da membrana plasmática levaria a uma ação intracelular. Weaver et al. (1978) demonstraram por meio de marcadores radioativos que esta droga é incorporada no interior da célula beta, onde sofre decomposição. Boquist (1980) propôs que a aloxana atuaria inibindo o sistema de transporte mitocondrial dos fosfatos

inorgânicos, levando à diminuição do pH intracelular e à morte da célula. Bell & Hye (1983) postularam que a aloxana interfere na oxidação intracelular de glicose.

Existem críticas quanto ao uso da Aloxana para a indução do diabetes experimental, mas seu emprego se justifica devido à experiência já desenvolvida com este método. Os estudos anteriores já apontaram as diversas variáveis no uso da Aloxana, como a dose a ser utilizada, o modo de emprego, a necessidade de jejum antes da sua aplicação, a via a ser utilizada para a injeção e o sistema idealizado para a aplicação (Macedo et al., 1981, 1985, 1986; 1987; Spadella, 1989; Breim, 1990). 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 aparecimento da doença diabética por certo período, principalmente períodos próximos à indução, com a posterior regressão espontânea do estado diabético (Spadella, 1989). 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.

A aloxana é uma droga nefrotóxica (Von Sallman, 1971), não

devendo ser usada em estudos que envolvam avaliação de função renal. Como este não é um dos objetivos deste estudo, não vem a ser um fator relevante.

A aloxana administrada por via intravenosa, na dose de 42mg/kg de peso corporal, produziu em nossos animais diabetes importante, com desenvolvimento de alterações clínicas e laboratoriais bem definidas.

A margem entre a dosagem diabetogênica e a dose letal é estreita (Junod et al., 1969; Rossini et al., 1977). No início deste estudo, ainda na fase de padronização, utilizou-se aloxana por via endovenosa, na dose de 50mg/kg de peso, em animais em jejum de 14 horas. Com tal procedimento, 75% dos animais tornavam-se diabéticos e, em 30 dias de evolução, a mortalidade era de 100%. Em vista disso e com base na literatura que apontava doses de aloxana de 40-45mg/kg de peso como diabetogênicas (Lazarow et al., 1984; Lukens, 1948; Bell & Hye, 1983; Garriss et al. 1984), optou-se pela redução da dose para 42mg/kg.

Lukens (1948), em extensa revisão da literatura a respeito dos efeitos da aloxana sobre animais de várias espécies, observou índices muito variáveis de mortalidade, oscilando entre 33 e 100%. Esses índices estão ligados a múltiplos fatores que são capazes de mudar os efeitos da aloxana e a sensibilidade do hospedeiro, envolvendo o estado de hidratação da droga,

a velocidade de infusão, a via de administração, a dieta, o tempo de jejum, o peso do animal e, até, a utilização de substâncias capazes de influenciar seus mecanismos de ação, tais como barbitúricos, ácido nicotínico, etc. Os ratos, por exemplo, são mais sensíveis à aloxana se alimentados, previamente, com dieta contendo alto teor de gorduras. A taxa de mortalidade, nestes casos, alcança de 90 a 100% dos animais. Dietas pobres em gordura e com altas concentrações de proteínas e carboidratos, diminuem esses índices.

Alguns ratos que recebem a aloxana não se tornam diabéticos e a intensidade de diabetes pode ser diferente em cada animal. Com a mesma metodologia, Spadella (1989) observou que 41,2% dos ratos desenvolvem diabetes graves e 20% não desenvolvem a doença.

Os mesmos fatores que atuam nos índices de mortalidade influenciam o desenvolvimento ou não do diabetes. Se a aloxana for administrada ao animal após jejum prolongado, cerca de 95% desses animais, tornar-se-ão diabéticos. Se a mesma dose for administrada, porém não se mantendo o jejum, a resposta diminui para 25% (Lukens, 1948, Spadella, 1989).

Lukens (1948) cita que a toxicidade da aloxana se altera em relação linear com o peso do animal, aumentando de 0,73 poderes de toxicidade para cada unidade de peso. Cita ainda, o mesmo autor, que

animais que não respondem a uma primeira dose de aloxana podem ser refratários a injeções posteriores, de doses similares.

Quanto à via de administração da droga, foi utilizada a endovenosa, por ser considerada a mais eficaz (Bell & Hye, 1983). Pode-se usar, ainda, as vias subcutânea e intra-peritoneal, que são satisfatórias no rato, enquanto para animais maiores há necessidade de doses muito elevadas para a obtenção do mesmo efeito diabetogênico. A via oral, porém, é usualmente insatisfatório para a aloxana, embora seja possível, após período prolongado de jejum e com ingestão rápida, a produção de diabetes em ratos, coelhos e gatos (Lukens, 1948).

Quando a via endovenosa é usada, a velocidade de infusão da droga é importante. Doses efetivas de aloxana não produzem diabetes se injetadas muito lentamente. A colocação prévia do animal em caixas aquecidas com lâmpada elétrica foi importante para a vasodilatação das veias da cauda, facilitando a eficácia da aloxana.

Anestesia

Utilizou-se, no experimento, éter sulfúrico como agente anestésico, administrado por via inalatória, pelos seguintes motivos:

- facilidade de indução anestésica;
- baixo custo;

- fácil manuseio;
- maior facilidade de obtenção em relação aos outros agentes anestésicos.

Além disso, enfatizam-se o baixo índice de mortalidade dos animais (Spadella, 1989) e a experiência do grupo de estudo com este método.

Quanto aos resultados

Avaliação clínica e laboratorial

O acompanhamento dos parâmetros clínicos e laboratoriais é fundamental no que diz respeito à real ocorrência da doença diabética nestes animais e a manutenção do estado diabético no decorrer do período de observação, pois sabe-se que há possibilidade de não indução ou reversão do diabetes (Spadella, 1989).

Parâmetros clínicos

Neste estudo, avaliou-se os animais quanto ao aspecto geral, peso, diurese, ingestão hídrica e ingestão alimentar.

O aspecto geral dos animais diabéticos diferiu acentuadamente dos do grupo controle, apresentando modificações que se acentuaram no decorrer do seguimento, compatível com doença crônica

diabética. O aspecto clínico observado foi compatível com diabetes grave (Spadella, 1989; Schellini, 1992).

O peso dos animais do grupo controle não sofreu variações durante o período de acompanhamento, o que era esperado, pois os animais estavam saudáveis.

Os animais diabéticos, em relação aos animais do grupo controle, apresentaram médias de peso inferiores 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 a dados da literatura que mostram perda aguda e acentuada de peso no início do desenvolvimento do diabetes (Clarson, 1986). Em M3, não encontramos diferença estatística 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 (Lee et al, 1971; Orloff, 1975; Ueda, 1979; Brekke, 1980; Rossi & Heldstab, 1981, 1986a; Calderon, 1988; Spadella, 1989; Breim, 1990).

Parâmetros bioquímicos

Os animais do grupo controle mantiveram valores de glicemia compatíveis com dados da literatura sobre animais normais da mesma

espécie (Orloff et al, 1975; Ueda et al, 1979; Reddi, 1985; Macedo et al, 1986; Vinos et al, 1988).

Tanto a glicemia quanto a glicose urinária estiveram acima dos valores observados para os animais controle, nos três momentos de observação, o que foi importante, juntamente com as manifestações clínicas já descritas, para caracterizar o quadro diabético desencadeado e mantido ao longo do experimento (Jonasson et al, 1985; Sherwin, 2000).

Os valores de glicemia nos animais diabéticos, estiveram mais acentuados no início do experimento e estas flutuações glicêmicas podem ocorrer por fatores ligados a estresse, ingestão alimentar, entre outros.

A glicosúria também ocorre com frequência no diabetes (Clarson, 1986; Sherwin, 2000) e ocorreu de forma ainda mais acentuada, pois a aloxana é, por si só, nefrotóxica (Von Sallman, 1971).

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

A análise histológica feita na retina de ratos mostrou que a mesma possui distribuição das camadas, células e vasos semelhante à descrita para a retina humana (Hogan, 1971).

Apesar das alterações diabéticas serem, na maioria das vezes, submicroscópicas, foi possível observar diferenças microscópicas entre o GC e o GD, como os grânulos de glicogênio nos segmentos externos de

cones e bastonetes, presentes também em animais normais, porém mais freqüentes em diabéticos e melhor evidenciados com auxílio da coloração de PAS. O exato papel destes depósitos é, até o momento, desconhecido e será discutido a seguir.

Tanto na microscopia óptica, quanto na eletrônica, foi possível observar a íntima relação entre os fotorreceptores e o epitélio pigmentar.

Os fotorreceptores e o epitélio pigmentar representam uma unidade funcional altamente diferenciada. O epitélio pigmentar possui importante papel na renovação dos discos dos segmentos externos dos fotorreceptores, um fenômeno interessante, marcado pela presença dos fagossomos no citoplasma das células pigmentares, assim como pela fagocitose dos discos.

Desequilíbrio neste processo pode levar a várias doenças retinianas, como a retinose pigmentar (Steinberg et al., 1977). Porém, com relação ao diabetes, não se observou alterações na interação fotorreceptores / epitélio pigmentar.

Em estudos anteriores (Schellini, 1992; Jorge, 1996), a avaliação do epitélio pigmentar de ratos normais e diabéticos aloxânicos, mostrou que os diabéticos apresentam aumento dos corpos densos e

diminuição das invaginações basais nas células do epitélio pigmentar, denotando alterações nesta camada. Apesar disso, a morfologia dos elipsóides não esteve alterada nos animais mais velhos (GC-M3), nem tampouco nos diabéticos (GD) aqui observados.

A análise feita sobre a camada de cones e bastonetes no presente estudo, mostrou que os segmentos externo e interno dos cones e bastonetes de ratos do grupo diabético apresentaram-se mais espaçados entre si em M3, o que nos leva a supor, uma diminuição no número de cones e bastonetes.

Esse espaçamento entre as células da camada de cones e bastonetes também pode ser um indício de que a involução senil é mais precoce em diabéticos, já que Cano et al. (1986) observaram diminuição de cones e bastonetes em ratos normais mais velhos que os que compuseram o GD-M3, com idade entre 29 a 31 meses.

Em olho enucleado por melanoma da coróide, de paciente com 73 anos, na porção normal da retina, foram encontrados corpos de fotorreceptores esparsos e ausência do segmento externo em algumas regiões, podendo este achado ser sugestivo de senilidade (Buchanan, 1988).

Experimentalmente já foi evidenciado que o número de fotorreceptores pode diminuir em até 15%, em decorrência da senescência (Katz & Robison, 1986).

A diminuição ocorre com velocidade de perda de cerca de 0,2 a 0,4% ao ano, havendo diminuição maior de bastonetes (Panda-Jones et al., 1995). Portanto, parece estabelecido que a densidade dos fotorreceptores diminui com a idade.

Apesar da diminuição dos fotorreceptores ocorrer por toda a retina (Panda-Jones et al., 1995), é mais pronunciada na fóvea que na periferia da mesma (Gao & Hollyfield, 1992).

Além da senilidade, a diminuição dos fotorreceptores ocorre no diabetes, como evidenciado no presente estudo.

A destruição de fotorreceptores pode também ser decorrente de toxicidade química ou de fototoxicidade ou ser provocada por dietas ricas em sucrose (Korte et al., 1986).

Outra causa apontada para diminuição do número de fotorreceptores, seria a deficiência de vitamina E (Robison et al., 1979).

Observou-se em camundongos portadores de gene para degeneração de retina que existe diminuição do número de fotorreceptores, com perda da função visual (Jansen & Sanyal, 1984). A diminuição das

células ocorre nas camadas dos fotorreceptores, nuclear externa e a plexiforme externa, com acúmulo de macrófagos (Sanyal et al., 1980).

A presença de corpos densos e lisossomos no interior do segmento interno dos fotorreceptores foi mais freqüente em animais diabéticos, principalmente no M3, evidenciando o processo de degeneração das organelas citoplasmáticas, já que as mesmas estão envolvidas na remoção dos detritos celulares.

O aumento dos corpos densos na RD foi visto, principalmente, nas células e nos prolongamentos citoplasmáticos mais próximos aos vasos (Hori et al., 1980; Schellini, 1992), ocorrendo para que haja eliminação dos debris derivados dos pericitos necróticos e digestão do glicogênio acumulado na retina em condições diabéticas (Hori et al., 1992).

Nas células que não estão próximas aos vasos, como é o caso dos fotorreceptores, o processo de remoção dos detritos também ocorre, provavelmente de forma diferente que nos locais onde existe circulação. Já foi provado que a elastase, a qual possui atividade proteolítica, é a mais importante enzima para a remoção de substâncias nos tecidos não vasculares da retina (Laver et al., 1993).

Os vacúolos opticamente vazios, contendo “figuras de Mielina”, são também fatores que exprimem a necrose de estruturas citoplasmáticas.

Quanto aos “cistos glicogênicos”, não há nenhuma publicação que faz referência a essas estruturas, com exceção do trabalho de Schellini (1992). Existem outros estudos que se referem à presença de glicogênio livre em fotorreceptores, como por exemplo, Kuwabara & Cogan (1961) e Hogan et al. (1971). Porém, mesmo tendo sido comprovada a existência de glicogênio livre pela coloração de PAS à microscopia óptica, não existe nenhuma citação quanto à observação de estruturas na forma cística.

Além do glicogênio, outra substância que foi evidenciada nos fotorreceptores foi o carboidrato. O uso de um marcador, a lecitina, mostrou que existem sítios de resíduos de carboidratos, tanto nos dois segmentos dos fotorreceptores, como no epitélio pigmentar (Bopp et al., 1994).

Também existe relação dos fotorreceptores com a lactose, uma vez que já foi observado que a lactose promove a organização e formação dos fotorreceptores em pesquisa de órgão isolado (Jablonski et al., 1999).

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, notou-se que o aparecimento de “cistos glicogênicos” pode estar relacionado a

alguma descompensação metabólica decorrente do estado diabético, já que estes “cistos” foram observados com maior frequência nestes animais.

Outro fator importante é que os “cistos glicogênicos” foram encontrados também nos ratos normais, principalmente no GC M3, evidenciando que a presença destes cistos pode estar relacionada com a involução senil. No grupo GD M3, o número de cistos foi maior que nos animais dos outros grupos, o que demonstra que o aparecimento dos mesmos pode ser uma das lesões crônicas degenerativas do diabetes .

Os “cistos glicogênicos” ocorreram com maior frequência nos bastonetes, do que nos cones. Esse encontro merece novos estudos e poderia ser um indício de que existem diferenças quanto ao grau de degeneração celular entre cones e bastonetes. Ou, simplesmente, os "cistos glicogênicos" possuem uma localização preferencial em bastonetes por diferenças bioquímicas entre os dois fotorreceptores que possuem funções distintas: visão diurna para os cones e noturna para os bastonetes.

O aumento do glicogênio pode ser resultado da excessiva oxidação de ácidos gordurosos que ocorre no diabetes (Beaumont et al., 1971).

O aparecimento destes “cistos glicogênicos” poderia, ainda, estar relacionado à diminuição da acuidade visual no diabético.

As observações da ultra-estrutura permitiram supor que estes cistos se originem de mitocôndrias em estado degenerativo. A gênese das alterações retinianas pode estar relacionada com esta importante organela. Este é um ponto que merece a realização de novos estudos.

As mitocôndrias apresentaram, ainda, outras evidentes alterações, como mudanças na morfologia (mais redondas), edema e diminuição do número de cristas. Por serem estas organelas muito importantes na produção de energia para a célula, estes achados podem sugerir a falência do sistema responsável pela produção de energia celular.

A falta de nutrientes que pode ocorrer em consequência do estado diabético, pode levar a danos para as células retinianas como um todo. Lesões semelhantes as observadas na retina dos ratos diabéticos, foram também evidenciadas após oclusão da artéria central da retina, ocorrendo edema nas camadas mais internas da retina após 2 horas da oclusão, que aumenta por 4 horas, seguido da desintegração da retina após 24 horas (Radius & Anderson, 1981).

Assim, o edema caracterizado por excesso de gel citoplásmico, além de acúmulo de organelas (Radius & Anderson, 1981), não é condição unicamente existente na deprivação de oxigênio, mas também advém de alteração do metabolismo anaeróbico, muito importante na nutrição da retina e que se encontra alterado no diabetes.

Em pesquisas feitas com ratos diabéticos, já ficou bem estabelecido que o poliol também está implicado na gênese da RD (Robison et al., 1989 a, b).

Outro ponto importante é o papel da galactose na RD. Lesões semelhantes às que existem na RD são obtidas com dietas ricas em galactose, podendo as mesmas serem prevenidas por tratamento com inibidores da aldose redutase (Robison et al., 1989; Robison et al., 1991).

A camada nuclear externa apresenta como característica a distribuição da cromatina, mais concentrada no centro do núcleo do que próximo a carioteca. Esta, também, é uma característica ímpar que ocorre na retina. Os núcleos são muito próximos uns dos outros, praticamente não havendo espaços entre os mesmos.

Por esta característica da disposição dos núcleos, qualquer acúmulo de substâncias seria danoso para as células e poderia resultar em morte celular. Porém, com as alterações metabólicas que se estabelecem na RD, o acúmulo de líquido por edema é freqüente e foi observado em alguns campos, representado pela separação dos núcleos entre si.

Nesta camada, o que mais evidente ficou como alteração do diabetes foi a alteração da distribuição da cromatina e o aparecimento dos núcleos picnóticos.

Os núcleos picnóticos seriam a expressão da morte celular.

Os "cistos glicogênicos" foram também observados no citoplasma celular, em algumas células.

Os prolongamentos citoplasmáticos das células de Müller, observados nesta camada, em ratos diabéticos apresentaram aumento dos corpos densos.

As células de Müller possuem papel fundamental na nutrição retiniana, sendo as responsáveis pelo armazenamento do glicogênio (Hogan & Feeney, 1963). São também importantes na remoção de detritos celulares, digerindo e eliminando corpos residuais e substâncias tóxicas (Hori & Mukai, 1980). Alterações diabéticas nestas células já foram relatadas (Hori et al., 1980; Schellini et al., 1995), sendo evidente que as mesmas sofrem com a descompensação metabólica diabética.

Portanto, o presente estudo mostrou que os fotorreceptores de ratos sofrem alterações em decorrência do processo de involução senil, alterações essas que são mais freqüentes e importantes quando o animal é diabético.

A identificação das lesões, o tratamento e a prevenção das mesmas poderão melhorar a qualidade de vida dos diabéticos.

CONCLUSÕES

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

- Os animais de GC M3 diferiram dos de GC M2 na avaliação da ultra-estrutural retiniana, podendo-se sugerir que GC M3 apresente alterações senis.
- Os animais de GC diferiram dos de GD quanto à avaliação morfológica, tanto em M2, como em M3, demonstrando que o estado diabético provoca alterações na camada de fotorreceptores.
- Os animais do grupo GD M3 apresentaram, com maior frequência que os de GD M2 aumento de lisossomos, corpos densos e “cistos glicogênicos”, o que pode refletir o caráter progressivo das lesões diabéticas.

REFERÊNCIAS

- ABUJAMRA, S., ULSON, A.C.B. Análise de 400 pacientes diabéticos portadores de retinopatia. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v.49, p.9-12, 1986.
- AIELLO, L.M., CAVALLERANO, J.D. Ocular complications of diabetes mellitus. In: KAHN, C.R., WEIR, G.C. (Eds). **Joslin's diabetes mellitus**. 13.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. p.771-93.
- AIELLO, L.P., CAHILL, M.T., WONG, J.S. Systemic considerations in the management of diabetic retinopathy. **Am. J. Ophthalmol.**, v.132, p.760-76, 2001.
- ALBERTI, K.G., ZIMMET, P.Z. 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.**, v.15, p.539-53, 1998.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: Guide to diagnosis and classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. **Diabetes Care**, v.20, supp.1, s21-s27, 1997.
- ARDUINO, F. O Diabetes através dos tempos. In: _____. **Diabetes Mellitus e suas complicações**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1962. p.1-6.
- ARDUINO, F. O diabetes ontem e hoje. In: _____. **Diabetes Mellitus**. 3.ed. Rio Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. p.1-3.

- ARMALY, M.F., BALOGLOU, P.J. Diabetes mellitus and the eye. Intraocular pressure and aqueous outflow facility. **Arch. Ophthalmol.**, v.77, p.485-99, 1967.
- ARMALY, M.F., KRUEGER, D.E., MAUNDER, L., et al. Biostatistical analysis of the collaborative glaucoma study. **Arch. Ophthalmol.**, v.98, p.2163-71, 1980.
- ASHTON, N. Vascular changes in diabetes with particular reference to the retinal vessels. **Br. J. Ophthalmol.**, v.33, p.407-20, 1949.
- ASHTON, N. Diabetic microangiopathy. **Adv. Ophthalmol.**, v.8, p.1-84, 1958.
- BABEL, J., LEUENBERGER, P. A long term study on the ocular lesions in streptozotocin diabetic rats. **Albrecht Von Graefes. Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.**, v.189, p.191-209, 1974.
- BAILEY, C.C., SPARROW, J.M. Visual symptomatology in patients with sight-threatening diabetic retinopathy. **Diabet. Med.**, v.18, p.883-8, 2001.
- BALLANTYNE, A. J. Retinal changes associated with diabetes and with hypertension. **Arch. Ophthalmol.**, v.33, p.97-105, 1945.
- BALLANTYNE, A.J., LÖWENSTEIN, A. The pathology of diabetic retinopathy. **Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.**, v.63, p.95-115, 1943.
- BAZAN, N.G., GORDON, N.C., MARCHESELLI, V.L., et al. Experimental models and their use in studies of diabetic retinal microangiopathy. **Therapie**, v.52, p.447-51, 1997.

- BEAUMONT, P., SCHOFIELD, P.J., HOLLOWES, F.C., et al. Growth hormone, sorbitol and diabetic capillary disease. **Lancet**. v.1, p.579-81, 1971.
- BELL, R., HYE, R.J. Animal models of Diabetes Mellitus: physiology and pathology. **Surg. Res.**, v.35, p.433-60, 1983.
- BENNETT, P.H. Definition, diagnosis, and classification of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. In: KAHN, C.R., WEIR, G.C. (Eds). **Joslin's diabetes mellitus**. 13.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. p.193-200.
- BENSON, W.E. Diabetic retinopathy. In: TASMAN, W., JAEGER, E.A. (Eds). **Duane's clinical ophthalmology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998. v.3, chap.30. CD-ROM.
- BERKOWITZ, B.A., ITO, Y., KERNT, S., et al. Correction of early subnormal superior hemiretinal DeltaPO(2) predicts therapeutic efficacy in experimental diabetic retinopathy. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.42, p.2964-9, 2001.
- BLANKS, J.C. Morphology of the retina. In: RYAN, S.J. **Retina**. St. Louis: Mosby, 1989. v.1, cap.4, p.37-56.
- BLOODWORTH JR., J.M.B., MOLITOR, D.L. Ultrastructural aspects of human and canine diabetic retinopathy. **Invest. Ophthalmol.**, v.4, p. 1037-48, 1965.
- BLOODWORTH JR., J.M.B., ENGERMAN, R. L., POWERS, K.L. Experimental diabetic microangiopathy: basement membrane statistics in the dog. **Diabetes**, v.18, p.455-8, 1969.

- BOPP, S., EL-HIFNAWI, S., LAQUA, H. The photoreceptor cells and retinal pigment epithelium of normal and diseased human retinas express different glycoconjugates. **German J. Ophthalmol.** v.3, p.27-36, 1994.
- BOQUIST, L. A new hypothesis for alloxan diabetes. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v.88, p.221, 1980.
- BREIM, L.C. **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. Dissertação (Mestrado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade Medicina, Universidade Estadual Paulista.
- BREKKE, I.B., GULLESEN, I., REFSUM, S.B., FLATMARK, A. Long-term endocrine function of duct-ligated pancreas isotransplants in rats. **Eur. Surg. Res.**, v.12, p.167-78, 1980.
- BRESNICK, G.H., ENGERMAN, R., DAVIS, M.D., et al. Patterns of ischemia in diabetic retinopathy. **Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.**, v.81, p.694-709, 1976.
- BUCHANAN, T.A., GARDINER, T.A., DE JESUS, V., et al. Retinal ultrastructural findings in cone degeneration. **Am. J. Ophthalmol.**, v.106, p.405-13, 1988.
- BUCHI, E.R., KUROSAWA, A., TSO M.O. Retinopathy in diabetic hypertensive monkeys: a pathologic study. . **Albrecht Von Graefes. Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.**, v.234, p.388-98, 1996.

- CAIRD, F.I., PIRIE, A., RAMSELL, T.H. **Diabetes and the eyes**. Oxford: Blackwells, 1969. p.81-7.
- CALDERON, I.M.P. **Modelo experimental em ratos para estudo do binômio diabete e gravidez**. Botucatu, 1988. 125p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista.
- CALDWELL, R.B., SLAPNICK, S.M., MCLAUGHLIN, B.J. Quantitative freeze - fracture and filipin - binding study of retinal pigment epithelial - cell basal membranes in diabetic rats. **Exp. Eye Res.**, v.44, p.245-59, 1987.
- CANO, J., MACHADO, A., REINOSO-SUAREZ, F. Morphological changes in the retina of ageing rats. **Arch. Gerontol. Geriatr.**, v.5, p. 41-50, 1986.
- CHEN, C.J., HERRING, J., CHEN, A.S. Managing diabetic retinopathy: the partnership between ophthalmologist and primary care physician. **J. Miss. State Med. Assoc.**, v.36, p.201-8, 1995.
- CLARSON, C., DANEMAN, D., MARTIN, J. Subclinical diabetes mellitus in the BB rat. **Diabetes Res.**, v.3, p.237-40, 1986.
- CULLIMAN, T.R. Diabetic retinopathy and visual disability. **Diabetologia**, v.23, p.504-6, 1982.
- CUNHA-VAZ, J.G. Pathophysiology of diabetic retinopathy. **Br. J. Ophthalmol.**, v.62, p.351-5, 1978.
- DE JUAN E., HUMAYUN M.S., HATCHELL D.L., WILSON D. Histopathology of experimental preretinal neovascularization. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.30, p.1495-503, 1989.

DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP:

Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy: clinical application of Diabetic Retinopathy Study (DRS) findings, DRS report number 8. **Ophthalmology**, v.88, p.583-600, 1981.

DOGRU, M., KATAKAMI, C., INOUE, M. Tear function and ocular surface changes in noninsulin-dependent Diabetes Mellitus. **Ophthalmology**, v.108, p.586-92, 2001.

DOWLING, J.E. Organization of vertebrate retinas. **Invest. Ophthalmol.**, v.9, p.665, 1970.

DUHAULT, J., LEBON, F., BOULANGER, M. Microangiopathie diabetique-etude comparative chez l'homme et l'animal. **Biorheology**, v.11, p.167-78, 1974.

DUKE-ELDER, S. Diseases of the carbohydrate metabolism. In: **Diseases of the retina**. London: Henry Kimpton, 1967. p.408-47.

DUNN, J.S., SHEEHAN, H.L., MCLEITCHIE, N.G.B. Necrosis of islets of Langerhans produce experimentally. **Lancet**, v.1, p.484, 1943.

EARLY TREATMENT DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP: Early photocoagulation for diabetic retinopathy. **Ophthalmology**, v.98, p.766-85, 1991.

ENGERMAN, R.L. Animal models of diabetic retinopathy. **Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.**, v.81, p.710-5, 1976.

ENGERMAN, R.L., BLOODWORTH JR., J.M.B. Experimental diabetic retinopathy in dogs. **Arch. Ophthalmol.**, v.73, p.205-10, 1965.

ENGERMAN, R., FINKELSTEIN, D., AGUIRRE, G., et al. Ocular complications. **Diabetes**, v.31, suppl.1, pt.2, p.82-8, 1982.

FELIG, P., BERGMAN, M. The Endocrine pancreas: Diabetes Mellitus. In: FELIG, P., BAXTER, J.D, FROHMAN, L.A. (Eds). **Endocrinology and metabolism**. New York: McGraw-Hill, 1995. p.1107-250.

FOSS, M.C. O olho e outros sistemas: problemas endócrinos e metabólicos. RODRIGUES, M.L.V. **Oftalmologia clínica**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1992. cap.26a, p.419-25.

FOSTER, D.W. Diabetes Melito. In: FAUCI, A.S, BRAUNWALD, E., ISSELBACHER, K.J., et al. (Eds). **Harrinson's principles of internal medicine**. 14.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill Interamericana do Brasil, 1998. v.2., cap.334, p. 2186-208.

FRANK, R.N. Etiologic mechanisms in diabetic retinopathy. In: RYAN, S. St. Luois: Mosby, 1989. v.2, cap.70, p.301-26.

FRANK, R.N., HOFFMAN, W.H., PODGER, M.J., et al. Retinopathy in juvenile-onset type I diabetes of short duration. **Diabetes**, v.31, p.874-82, 1982.

FRIEDENWALD, J.S. A new approach to some problems of retinal vascular disease. **Trans. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.**, v.53, p.73-87, 1948.

FRIEDENWALD, J.S. diabetic retinopathy. **Am. J. Ophthalmol.**, v.33, p. 1187-99, 1950.

FUKUDA, M. Clinical arrangement of classification of diabetic retinopathy. **Tohoku J. Exp. Med.**, v.141, p.331-5, 1983.

FUNDAÇÃO HILTON ROCHA. **Ensaio sobre a problemática da cegueira: Prevenção, recuperação, reabilitação.** Belo Horizonte, 1987.353p.

GAO, H., HOLLYFIELD, J.G. Aging of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.33, p.1-17, 1992.

GARRIS, D.R., WITEHEAD, D.S., MORGAN, C.R. Effects of alloxan-induced diabetes on corpus luteum function in the pseudopregnant rat. **Diabetes**, v.33, p.611-5, 1984.

GIBBS, G., WILSON, R., HO. C.K. Experimental diabetes in the monkey. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PRIMATES, 2, 1969, New York. **Proceedings...** New York: Karger, 1969. v.3.

GILBERT, R.E., KELLY, D.J., COXA, A.J., et al. Angiotensin converting enzyme inhibition reduces retinal over-expression of vascular endothelial growth factor and hyperpermeability in experimental diabetes. **Diabetologia**, v.43, p.1360-7, 2000.

GREY, R.H., MALCOLM, N., O'REILLY, D., MORRIS, A. Ophthalmic survey of a diabetic clinic. I: Ocular findings. **Br. J. Ophthalmol.**, v.70, p.797-803, 1986.

HAMANAKA, T., AKABANEM, N., YAJIMA, T., et al. Retinal ischemia and angle neovascularization in proliferative diabetic retinopathy. **Am. J. Ophthalmol.**, v.132, p.648-58, 2001.

HAMMES, H.P., BROWNLEE, M., EDELSTEIN, D., et al. Aminoguanidine inhibits the development of accelerated diabetic

retinopathy in the spontaneous hypertensive rat. **Diabetologia**, v.37, p.32-5, 1994. XXXX

HARKNESS, J.E., WAGNER, J.E. **Biologia clínica de coelhos e roedores**. São Paulo: Roca, 1993. 238p.

HARRIS, M.I., HADDEN, W.C., KNOWLER, W.C., BENNETT, P.H. Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance and plasma glucose levels in U.S. population aged 20-74 yr. **Diabetes**, v.36, p.523-34. 1987.

HAUT J., REDOR, J.Y., ABOUD, E., et al. Classification of diabetic retinopathy. **Ophthalmologica**. v.195, p.145-55, 1987.

HEATH, H. Experimentally induced retinopathies in relation to the problem of diabetes. **Br. Med. Bull.**, v.26, p.151, 1970.

HIRATA, C.E., FANG, T., CASELLA, A.M.B., et al. Prevalência de retinopatia em uma população de diabéticos. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.49, p. 31-33, 1986.

HOGAN, M.J., FEENEY, L. The ultrastructure of the retinal vessels-vascular glial relationships. **J. Ultrastruct. Res.**, v.9, p.47-64, 1963.

HOGAN, M.J., ALVARADO, J.A., WEDDELL, J. E. Retina. In: **Hystology of the human eye**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1971. cap. 9, p.393-519.

HORI, S., MUKAI, N. Ultrastructural lesions of retinal peripapillary Muller cells in streptozotocin-diabetic rats. **Albrecht Von Graefes Klin. Exp. Ophthalmol.**, v.213, p.1-9, 1980.

- HORI, S., NISHIDA, T., MUKAI, N. Ultrastructural studies on lysosomes in retinal Muller cells of streptozotocin-diabetic rats. **Invest. Ophthalmol. Vis Sci.**, v.19, p.1295-300, 1980.
- IONESCU-TIGORVISTE, C. Insulin, the molecule of the century. **Arch. Physiol. Biochem.**, v.104, p.807-13, 1996.
- ISHIBASHI T. Cell biology of intraocular vascular diseases. **Nippon Ganka Gakkai Zasshi**, v.103, p.923-47, 1999.
- ISHIKAWA, T. Fine structure of retinal vessels in man and macaque monkey. **Invest. Ophthalmol.**, v.2, p.1-8, 1963.
- JABLONSKI M.M., WOHABREBBI A., ERVIN C.S. Lactose promotes organized photoreceptor outer segment assembly and preserves expression of photoreceptor proteins in retinal degeneration. **Mol. Vis.**, v.5, p.16, 1999.
- JACKSON. R.L., IDE, C.H., GUTHRIE, R.A., et al. Retinopathy in adolescents and young adults with onset of insulin-dependent diabetes in childhood. **Ophthalmology**, v.89, p.7-13, 1982.
- JANSEN, J.G., SANYAL, S. Development and degeneration of retina in rds mutant mice: electron microscopy. **J. Comp. Neurol.**, v.224, p.71-84, 1984.
- JONASSON, JONES, C.W., BAUMAN, C., et al. The pathophysiology of experimental insulin-deficient diabetes in the monkey: implications for pancreatic transplantation. **Ann. Surg.**, v.201, p.27-39, 1985.
- JORGE, E.C. **Retinopatia Diabética: estudo ultraestrutural e morfométrico do epitélio pigmentar de ratos normais e aloxânicos.**

Botucatu, 1996. 173p. Dissertação (Mestrado em Bases Gerais de Cirurgia e Cirurgia Experimental) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

JUNOD, A., LAMBERT, A.E., STAUFFACHER, W., et al. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **J. Clin. Invest.**, v.48, p.2129-39, 1969.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1982. 533p.

KASS, E.H., WAISBREN, B.A. A method for consistent induction of chronic hyperglycemia with alloxan. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.60, p.303, 1945.

KATZ, M.L., ROBISON, W.G. Evidence of cell loss from the rat retina during senescence. **Exp. Eye Res.**, v.42, p.293-304, 1986.

KECK, F.S. PFEIFFER, E.F. The first experimental diabetes mellitus. **Acta Diabetol. Lat.**, v.26, p.79-81, 1989.

KEEN, H. The prevalence of blindness in diabetics. **J. Coll. Physicians Lond.**, v.7, p.53-60, 1972.

KERN T.S., ENGERMAN R.L. Comparison of retinal lesions in alloxan-diabetic rats and galactose-fed rats. **Curr. Eye Res.**, v.13, p.863-7, 1994.

KERN T.S., ENGERMAN R.L. A mouse model of diabetic retinopathy. **Arch. Ophthalmol.**, v.114, p.986-90, 1996.

KINCAID, M.C. Pathology of Diabetes Mellitus. In: TASMAN, W., JAEGER, E.A. (Eds). **Duane's foundations of clinical ophthalmology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998. v.3, chap.18. CD-ROM.

KING, H., REWERS, M.M. WHO ad hoc diabetes reporting group global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. **Diabetes Care**, v.16, p.157-77, 1993.

KISSEN, A.T., BLOODWORTH JR., J.M.B. Ultra-structure of retinal capillaries of the rat. **Exp. Eye Res.**, v.1, p.1-4, 1961.

KLEIN, R., KLEIN, B.E.K., MOSS, S.E., et al. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. **Arch. Ophthalmol.**, v.102, p.520-6, 1984a.

KLEIN, R., KLEIN, B. E. K., MOSS, S.E., et al. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. **Arch. Ophthalmol.**, v. 102, p.527-32, 1984b.

KLEIN, R., KLEIN, B.E.K., MOSS, S.E., et al. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. XIV. Ten year incidence and progression of diabetic retinopathy. **Arch. Ophthalmol.**, v. 112, p.1217-28, 1994.

KLEIN, B.E.K., KLEIN, R., JENSEN, S.C. Open-angle glaucoma and older-onset diabetes. The Beaver Dam Eye Study. **Ophthalmology**, v.101, p. 1173-7, 1994.

KOHNER, E.M., OAKLEY, N.W. Progress in endocrinology and metabolism. **Metabolism**, v. 24, p.1085-102, 1975.

KOHNER, E.M., BARRY, P.J. Prevention of blindness in diabetic retinopathy. **Diabetologia**, v.26, p.173-9, 1984.

KORTE, G.E., BELLHORN, R.W., BURNS, M.S. Remodeling of retinal pigment epithelium in response to intraepithelial capillaries-evidence that capillaries influence the polarity of epithelium. **Cell Tissue Res.**, v. 245, p.135-42, 1986.

KRAUS, E.E., SMITH, C.H. Trigeminal Nerve. In: TASMAN, W., JAEGER, E.A. (Eds). **Duane's foundations of clinical ophthalmology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998. v.1, chap.36. CD-ROM.

KUWABARA, T., COGAN, D.G. Studies of retinal vascular patterns-normal architecture. **Arch. Ophthalmol.**, v.64, p.904-11, 1960.

KUWABARA, T., COGAN, D.G. Retinal glycogen. **Arch. Ophthalmol.**, v.66, p.96-104, 1961.

KUWABARA, T., COGAN, D.G. Retinal vascular patterns: mural cells of the retinal capillaries. **Arch. Ophthalmol.**, v.65, p.114-24, 1963.

KUWABARA, T., COGAN, D.G. Retinal vascular patterns-acellular change. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.4, p.1049-58, 1965.

LAVER N.M., ROBISON W.G., JR. PFEFFER B.A. Novel procedures for isolating intact retinal vascular beds from diabetic humans and animal models. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.34, p.2097-104, 1993.

LAZAROW, A., PALAY, S.L. Production and course of alloxan diabetes in the rats. **J. Lab. Clin. Med.**, v.31, p.1004-15, 1946.

LAZARUS, S.S, BENCOSME, S.A. Alterations of pancreas during cortisone diabetes in rabbits. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, v.89, p.114-49, 1955.

LEE, S., CHANDLER, J.G., KRUBEL, R., NAKAJI, N.T., ROSEN, H., ORLOFF, M.J. Relief of diabetes mellitus by heterotopic transplantation of the whole pancreas in inbred rats. **Surg. Forum**, v.22, p.75-7, 1971.

LEICKERT, K.H. Insulin precursors – a historical synopsis. First diabetes treatment trials using pancreas extracts. **Arzneimittelforschung**, v.25, p.439-42, 1975.

LERCO, M.M. **Caracterização do modelo experimental de Diabetes mellitus induzindo pela aloxana: estudos clínicos, laboratorial e histopatológico do rim, retina, coronária aorta e artéria ilíaca do rato.** Botucatu, 2000. 116p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

- LEUENBERGER, P.M., CAMERON, D., STAUFFACHER, W., et al.
Ocular lesions in rats rendered chronically diabetic with streptozotocin.
Ophthalmic Res., v.2, p.189-204, 1971.
- LEYS, A.M. The eye and renal diseases. In: TASMAN, W., JAEGER, E.A.
(Eds). **Duane's clinical ophthalmology**. Philadelphia: Lippincott-
Raven, 1998. v.5, chap.31. CD-ROM.
- LIETH, E., BARBERA, J., XU, B., et al. Glial reactivity and impaired
glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy.
Diabetes, v.47, p.815-20, 1998.
- LOVESTAN-ADRIAN, M., AGARDH, E., AGARDH, C.D. The temporal
development of retinopathy and nephropathy in type 1 diabetes mellitus
during 15 years diabetes duration. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v.45,
p.15-23, 1999.
- LOVESTAM-ADRIAN M., AGARDH, C.D., TORFFVIT, O., et al.
Diabetic retinopathy, visual acuity, and medical risk indicators. A
continuous 10-year follow-up study in Type 1 diabetic patients under
routine care. **J. Diabetes Complications**, v.15, p.287-94, 2001.
- LUKENS, F.D.W. Alloxan diabetes. **Physiol. Rev.**, v.28, p 304-30, 1948.
- MACEDO, A.R., SKIVOLOCKI, W.P., THOMPSON, K.R., et al.
Morphometric electron - microscopy study of the whole pancreas
transplantation on alloxan diabetic neuropathy. **Surg. Forum**, v.32,
p.379-80, 1981.

- MACEDO, C.S., GREENLEAF, G.E., SYERS, H.J., et al. Effect of whole pancreas transplantation on long-established kidney lesions in diabetes. **Surg. Forum**, v.36, p.346-8, 1985.
- MACEDO, C.S., MERCADANTE, M.C.S., MACEDO, A.R. Controle do diabetes por meio do transplante de ilhotas de Langerhans preparadas sem o emprego da digestão enzimática - estudo experimental no rato. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, v. 41, p.55-60, 1986.
- MACEDO, C.S., RIYUZO, M.K., MERCADANTE, M.C.S., et al. Nefropatia diabética em ratos. Estudo comparativo entre a diabetes induzida pela aloxana e pela estreptozotocina. In: JORNADA BRASILEIRA DE NEFROLOGIA PEDIÁTRICA, 41, 1987, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Pediatria, 1987. p.59.
- MACGREGOR L.C., MATSCHINSKY F.M. Experimental diabetes mellitus impairs the function of the retinal pigmented epithelium. **Metabolism Clin. Exp.**, v.35, p.28-34, 1986.
- MACHADO, J.L.M. **Neuropatia diabética experimental. Estudo morfológico e morfométrico do nervo ciático de ratos diabéticos.** Botucatu, 1993, 109p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- MAEDA, J. Electron microscopy of the retinal vessels - human retina. **Jpn. J. Ophthalmol.**, v.3, p.37-47, 1959.
- MALENFANT, M. Diabetic retinopathy: pathogenesis, risk factors, clinical picture, classification. **Bull. Soc. Belge Ophtalmol.**, v.256, p.11-23, 1995.

- MALERBI, D.A., FRANCO, L.J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 years. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. **Diabetes Care**, v.15, p.1509-16, 1992.
- MATSUI, M., SATO, Y. Classification of diabetic retinopathy and application standard of photocoagulation. **Nippon Ganka Gakkai Zasshi** . v.93, p.803-8, 1989.
- MAZZE, R.S., SINNOCK, P., DEEB, L., et al. An epidemiological model for diabetes mellitus in the United States: five mayor complications. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v.1, p. 185-91, 1985.
- MCDONNEL, J.M. Ocular embryology and anatomy. In: RYAN, S. J. **Retina**. St Louis: Mosby, 1989. v.1. cap.1, p.5-16.
- MCLEITCHIE, N.G. Alloxan diabetes: the sorcerer and his apprentice. **Diabetologia**, v.23, p.72-5, 1982.
- MELO, M., HASHIMOTO, M., SCHELLINI, S.A. Catarata e Diabetes tipo II. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.57, fasc. 4, 1994.
- MERIMEE, T.J. Comparative metabolic and clinical studies of sexual ateliotic dwarfs and diabetics. In: CAMERINI-DAVALOS, R.A., COLE, H.S. **Vascular and neurological changes in early diabetes**. New York: Academic Press, 1973. p.207-13.
- MIZUTANI, M., KERN, T.S., LORENZI, M. Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. **J. Clin. Invest.**, v.97, p.2883-90, 1996.

MOISER, M.A., GOTTNER, M.J. Identification of the pre-proliferative diabetic eye. **Metab. Pediatr. Syst. Ophthalmol.**, v.8, p.150-3, 1985.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 3.ed. New York: John Wiley, 1991. p.649.

MORDES, J.P., ROSSINI, A.A. Animal models of diabetes. **Am. J. Med.**, v.70, p.353-60, 1981.

MORDES, J.P., ROSSINI, A.A. Animal models of diabetes. In: MATBLE, A., KRALL, L.P., BRADLEY, R.F., et al. **Joslin's diabetes mellitus**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1985. p. 110-137.

MUNTEANU, G. The classification of diabetic retinopathy. **Oftalmologia**. v.37, p.207-9, 1993.

NELSON, L.B., MARTYN, L.J. In Metabolic diseases affecting the eye. In: TASMAN, W., JAEGER, E.A. (Eds). **Duane's foundations of clinical ophthalmology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998. v.3, chap.54. CD-ROM.

NORMAN, G.R., STREINER, D.L. **Biostatistics**: the bare essentials, St.Louis: Mosby-Year Book, 1994. p.260.

- OAKLEY, N., HILL, D.W., JOPLIN, G.F. ,et al. Diabetic retinopathy: the assessment of severity and progress by comparison with a set of standard fundus photographs. **Diabetologia**, v. 3, p.402-5, 1967.
- OLEFSKY, J. Diabete Melito. In: **WINGARDEN & SMITH. Cecil: tratado de medicina interna**. 18. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1990. v.2, cap. 231, p.1198-216.
- OLIVEIRA, J.E., MILECH, A., FRANCO, L.J. The prevalence of diabetes in Rio de Janeiro. The Cooperative Group for the Study of Diabetes Prevalence in Rio de Janeiro. **Diabetes Care**. v.19, p.663-6, 1996.
- ORLOFF, M.J., LEE, S., CHARTERS, A.C., et al. Long-term studies of pancreas transplantation in experimental Diabetes mellitus. **Ann. Surg.**, v.182, p198-206, 1975.
- PALMBERG, P., SMITH, M., WALTMAN, S., et al. The natural history fo retinopathy in insulin-dependent juvenile-onset diabetes. **Ophthalmology**, v.88, p.613-8, 1981.
- PANDA-JONES, S., JONAS, J.B., JAKOBCZYK-ZMIJA, M. Retinal photoreceptor density dcreases with age. **Ophthalmology**, v.102, p.1853-9, 1995.
- PANZRAM, G. Mortality and survival in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, v.30, p.123-31, 1987.
- PAPACHRISTODOULOU D., HEATH H., KANG S.S. The development of retinopathy in sucrose-fed and streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia**, v.12, p.367-74, 1976.

- PHILLIPS, W.B. Ocular manifestations of diabetes mellitus. **J. Ophthalmic Nurs. Technol.**, v.13, p.255-61, 1994.
- RADIUS, R.L., ANDERSON, D.R. Morphology of axonal transport abnormalities in primate eyes. **Br. J. Ophthalmol.**, v.65, p.767-77, 1981.
- RAKIETEN, N., RAKIETEN, M.L., NADKARNI, M.V. Studies in the diabetogenic action of streptozotocin. **Cancer Chemother. Pharmacol. Rep.**, v.29, p.91-4, 1963.
- REDDI, A.S. Collagen metabolism in the retina of normal and diabetic rats. **Exp. Eye Res.**, v.41, p.345-52, 1985.
- ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1975. p.238-50.
- ROBISON JR., W.G., KUWABARA T., BIERI, J.G. Vitamin E deficiency and the retina: photoreceptor and pigment epithelial changes. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.18, p.683-90, 1979.
- ROBISON JR., W.G., NAGATA, M., TILLIST, N., et al. Aldose reductase and pericyte-endothelial cell contacts in retina and optic nerve. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.30, p.2293-9, 1989a.
- ROBISON JR., W.G., NAGATA, M., LAVER, N., et al. Diabetic-like retinopathy in rats prevented with an aldose reductase inhibitor. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.30, p.2285-92, 1989b.
- ROBISON JR., W.G., TILLIST, N., LAVER, N., et al. Diabetes-related histopathologies of the rat retina prevented with an aldose reductase inhibitor. **Exp. Eye Res.**, v.50, p.355-66, 1990.

- ROBISON, W.G., MC CALEB, M.L., FELD, L.G., et al. Degenerated intramural pericytes ("ghost cells") in the retinal capillaries of diabetic rats. **Curr. Eye Res.**, v.10, p.339-50, 1991.
- ROCHA, H. **Ensaio sobre a problemática da cegueira:** prevenção, recuperação, reabilitação. Belo Horizonte: Fundação Hilton Rocha, 1987. 353p.
- RODRIGUES M., CURRIER C., YOON J. Electron microscopy of renal and ocular changes in virus-induced diabetes mellitus in mice. **Diabetologia**. v.24, p.293-9, 1983.
- RODRIGUES, A.C. **Coroidopatia diabética. Estudo ultraestrutural da coróide de ratos normais e diabéticos aloxânicos.** Dissertação. Botucatu, 2000. 135p. (Mestrado) – Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental. Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- ROSSI, G., HELDSTAB, A. Morphometric studies of pancreatic islets and retina vessels of rats with streptozotocin - induced latent diabetes. **Diabete Metab.**, v.7, p.77-86, 1981.
- ROSSINI, A.A., LIKE, A.A., CHIK, W.L. Studies of streptozotocin induced insulinitidis in diabetes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 2485-91, 1977.
- SANBORN, G.E., MAGARGAL, L.E., JAEGER, E.A. Venous occlusive disease of the retina. In: TASMAN, W., JAEGER, E.A. (Eds). **Duane's clinical ophthalmology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998. v.3, chap.15. CD-ROM.

- SANYAL, S., DE RUITER, A., HAWKINS, R.K. Development and degeneration of retina in rds mutant mice: light microscopy. **J. Comp. Neurol.** v.194, p.193-207, 1980.
- SASSANI, J.W. Glaucoma. In: TASMAN, W., JAEGER, E.A. (Eds). **Duane's foundations of clinical ophthalmology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998a. v.3, chap.19. CD-ROM.
- SASSANI, J.W., YANOFF, M., FINE, B.S. Uvea. In: TASMAN, W., JAEGER, E.A. (Eds). **Duane's foundations of clinical ophthalmology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998b. v.3, chap.11. CD-ROM.
- SAUDEK, C.D. Diabetes Mellitus. In: HARVEY, A.M, JOHNS, R.J., CKUSICK, V.A., OWENS, A.H., ROSS, R.S. (Eds). **The principles and practice of medicine**. 22.ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1988. p.956-68.
- SCHELLINI, S.A. **Retinopatia Diabética Experimental**: estudo estrutural, ultraestrutural e morfométrico da retina de ratos normais, diabéticos e diabéticos tratados. Botucatu, 1992, 160p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- SCHELLINI S.A., GREGORIO E.A., SPADELLA C.T., MACHADO J.L., DE MORAES-SILVA, M.A. Muller cells and diabetic retinopathy. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.28, p.977-80, 1995.
- SHERWIN, R. S. Diabetes mellitus. In: GOLDMAN, L., BENNETT, J.C. (Eds). **Cecil textbook of medicine**. 21.ed. Philadelphia: Saunders, 2000. p.1263-85.

- SHIELDS, M.B. Glaucoma primário de ângulo aberto. In: SHIELDS, M.B. **Glaucoma**. 2.ed. São Paulo: Panamericana, 1989. p.153-75.
- SIMA A.A., GARCIA-SALINAS R., BASU P.K. The BB Wistar rat: an experimental model for the study of diabetic retinopathy. **Metabolism**, v.32, p.136-40, 1983.
- SLAMOVITS, T.L., GLASER, J.S. The pupils and accommodation. In: TASMAN, W., JAEGER, E.A. (Eds). **Duane's clinical ophthalmology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998. v.2, chap.15. CD-ROM.
- SMITH, S. C. Diabetic retinopathy. **Nurs. Clin. North Am.**, v.27, p.745-59, 1992.
- SMITH, S.C. Diabetic retinopathy. **Nurse Pract. Forum**, v.9, p.13-8, 1998.
- SORSBY, A. Prevention of blindness - present prospects. **Health Trends**, v.5, p.7-15, 1973.
- SPADELLA, C.T. **Avaliação funcional do transplante pancreatoduodenal no rato diabético**. Botucatu, 1989. 220p. Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- SPIRANDELLI PE; SCHELLINI SA, GREGÓRIO E, PADOVANI CR. Ultrastructural and morphometric alterations in iris nerves of diabetic rats. **Invest. Ophthalmol.**, v.40, p.s446, 1999.
- STEINBERG, R.H., WOOD, I., HOGAN, M.J. Pigment epithelial ensheathment and phagocytosis of extrafoveal cones in human retins. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v.277, p.459-74, 1977.

TAKAHASHI Y. Optic nerve head circulation in alloxan-induced diabetic rabbits. **Nippon Ganka Gakkai Zasshi**, v.99, p.166-72, 1995.

TAYLOR, R.H., JONES, H. S., DODSON, P.M., et al. Diabetic eye disease: a natural history study. **Eye**, v.11, p.547-53, 1997.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATION TRIAL. **N. Engl. J. Med.**, v.342, p.381-9, 2000.

THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v.20, p.1183-97, 1997.

TILTON, R.G., LAROSE, L.S., KILO, C., et al. Absence of degenerative changes in retinal and uveal capillary pericytes in diabetic rats. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.27, p 716-21, 1986.

TOUSSAINT, D., DUSTIN, P. Electromicroscopy of normal and diabetic retinal capillaries. **Arch. Ophthalmol.**, v.70, p.96-108, 1963.

UEDA, T., LEE, S., SOTRCK, G., et al. Metabolic effect of alloxan diabetic rats before and after pancreas transplantation. **Proc. Anat. Microsurg. Soc.**, v.3, p.423-4, 1979.

VERMA D. Pathogenesis of diabetic retinopathy-the missing link?. **Med. Hypotheses**, v.41, p.205-10, 1993.

VINOES, S.C., CAMPOCHIARO, P.A., MAY, E.E., et al. Progressive ultrastructural damage and thickening of the basement membrane of the retinal pigment epithelium in spontaneously diabetic BB rats. **Exp. Eye Res.**, v.46, p.545-58, 1988.

- VON SALLMANN, L., GRIMES, P. Eye changes in streptozotocin diabetes in rats. **Am. J. Ophthalmol.**, v.1, p.312-9, 1971.
- WAIFE, S.O. Definition and Diagnosis of Diabetes. In: _____. **Diabetes Mellitus**. 7. ed. Indianapolis: Lilly and Company, 1967. cap.1. p.1 -11.
- WAND, M. Neovascular Glaucoma. In: RITCH, R., SHIELDS, M.B., KRUPIN, T. (Eds). **The glaucomas**. 2.ed. St. Louis: Mosby, 1996. p.1073-129.
- WEAVER, D.C., MCDANIEL, M.L., LACY, P.E. Alloxan uptake by isolated rats islets of Langerhans. **Endocrinology**, v.102, p.1847, 1978.
- WEIGEIST, T.A. Congressional testimony in support of Citizen's Budget proposal for the National Eye Institute for fiscal year 1990. Research to Prevent Blindness. Apud: KELLY, L.W., BARDEN, C.A., TIEDEMAN, J.S., et al. Alterations in viscosity and filterability of whole blood and blood cell subpopulations in diabetic cats. **Exp. Eye Res.**, v.56, p.341-7, 1993.
- WILSON, P.W., ANDERSON, K.M., KANNEL, W.B. Epidemiology of diabetes mellitus in the elderly. The Framingham Study. **Am. J. Med.**, v.80, p.3-9, 1986.
- YANOFF, M., FINE, B.S. **Ocular pathology**. Hagerstown: Harper & Row, 1975. p.565-85.
- YANOFF, M., FINE, B.S. Diabetes mellitus. In: YANOFF, M. **Patologia ocular**. São Paulo: Santos, 1991a. p.187-95.
- YANOFF, M., FINE, B.S. Retina . In: _____. **Patologia ocular**. São Paulo: Santos, 1991b. cap.11, p.131-52.

YOON, R.W, AUSTIN, M., ONODERA, T., NOTKINS, A.L. Virus induced diabetes mellitus. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. **N. Engl. J. Med.**, v.300, p.1173-7, 1979.

ALMEIDA, C.A.M. *Estudo das alterações estruturais e ultra-estruturais da camada de fotorreceptores da retina de ratos diabéticos aloxânicos*. Botucatu, 2002. 139p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a influência do diabetes sobre a camada de fotorreceptores (camada de cones e bastonetes e camada nuclear externa) da retina. Para isto, foi realizado experimento prospectivo, 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 foi realizada enucleação e preparo dos olhos para avaliação sob microscopia óptica e 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 observou-se nos animais do GC em M3, aumento de corpos densos e “cistos” glicogênicos na camada de cones e bastonetes e dispersão da cromatina na camada nuclear externa. Os ratos diabéticos apresentaram as mesmas alterações observadas no GC em M3, em maior intensidade. Observou-se ainda, que os animais do GD em M3 tiveram mais alterações que os do GD em M2. Concluiu-se que o diabetes provoca lesões progressivas nos fotorreceptores retinianos.

Palavras-chave: Retina; Diabetes; Aloxana; Ratos; Ultra-estrutura; Fotorreceptor; Cones; Bastonetes; Camada Nuclear Externa.

ALMEIDA, C.A.M. Structural and ultra-structural study of retina photoreceptor layer of aloxanic diabetic rats. Botucatu, 2002. 139p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the influence of diabetes on the photoreceptors layer (layer of cones and rods and external nuclear layer) of 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 in the animals of CG-M3: dense bodies and glycogenic "cists" increase in the cones and rods layer and chromatin dispersion in the external nuclear layer. The diabetic rats had presented the same alterations observed in the CG-M3, in larger intensity. It was still observed, that the animals of DG-M3 had more alterations than the ones on DG-M2. It was ended that diabetes provokes progressive injuries in the retinal photoreceptors.

Keywords: Retina; Diabetes; Aloxana; Rats; Ultra-structure; Photoreceptor; Cones; Rods; External Nuclear Layer.