

Fábio Triglia Pinto

**Alterações morfológicas nos vasos da íris
de ratos normais e diabéticos aloxânicos**

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Cirurgia na
Área de Concentração “Bases
Gerais da Cirurgia e Cirurgia
Experimental”, para obtenção do
título de Mestre em Cirurgia.

Orientadora: Profª. Dra. Silvana Artioli Schellini

Faculdade de Medicina de Botucatu

Universidade Estadual Paulista

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

Pinto, Fábio Triglia.

Alterações morfológicas nos vasos da íris de ratos normais e diabéticos
aloxânicos / Fábio Triglia Pinto. – 2002.

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

Orientadora: Silvana Artioli Schellini

1. Íris (Olhos) – Vasos sanguíneos - Morfologia - Estudos experimentais

CDD 617.72

Palavras-chave: Diabetes experimental; Rato; Vasos; Microscopia eletrônica
de transmissão

Dedicatória

Dedicatória

Aos meus pais, **Waldiro** e **Ioli**, que sempre me orientaram e apoiaram nos momentos mais difíceis. À vocês todo o meu carinho, reconhecimento e gratidão!

À **minha esposa Cleide**, companheira fiel e dedicada, sem seu apoio e compreensão, eu não teria conseguido.

Com todo meu amor!

Homenagem

Homenagem

À minha orientadora **Profa. Dra. Silvana Artioli Schellini**, por todo empenho, paciência, carinho e dedicação.

Sem a sua grande capacidade de direção e compreensão, eu não teria sido capaz de realizar este Trabalho.

O meu muito obrigado!

Agradecimentos

Agradecimentos

A **CAPES** pelo apoio financeiro recebido para realização deste projeto.

À **Profa. Dra. Elisa Aparecida Gregório**, do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu, pela franquia do Laboratório de Microscopia Eletrônica e pela orientação e análise das micrografias deste Trabalho.

Ao **Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani**, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociência - UNESP, pela execução e orientação das análises estatísticas.

Ao **Prof. Dr. Arthur Roquete de Macedo**, criador do Grupo de Estudos do Diabetes Experimental da UNESP e ao **Prof. DR. César Tadeu Spadella**, atual coordenador do grupo.

Aos funcionários do setor de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, **Sr. Nathanael Pinheiro Salles**, **Sra. Vera Lúcia Aparecida Miguel** e à **Sra. Regina Célia Spadin**, pelas orientações e incentivo ao longo da realização deste Trabalho.

Aos **funcionários do Laboratório de Microscopia Eletrônica** do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu, **Sra. Maria Helena Moreno**, **Sra. Maria Euleda Lino Peres** e especialmente para o **Sr. Nivalde Antônio Bassa**, pela atenção e dedicação e processamento das microscopias.

À bibliotecária **Rosemary Cristina da Silva**, pela revisão das Referências Bibliográficas.

À bibliotecária **Elza Numata**, pela realização de “Ficha Catalográfica”.

À professora e tradutora **Sra. Norma Sylvia Bombini**, pela revisão ortográfica da Dissertação e do “Abstract”.

Agradecimento especial

Agradecimento especial

Ao meu professor e amigo **Prof. Dr. José Augusto Alves Ottaiano**, que com sua visão do futuro, capacidade diretiva, exemplo de profissional respeitado e competente, sempre me incentivou a seguir procurando aperfeiçoar meus conhecimentos técnicos e acadêmico.

À você devo grande parte do profissional que hoje sou. Obrigado!

Epígrafe

Epígrafe

“Com todos esse bens eu me alegrei, porque é a sabedoria que os guia,

mas ignorava que ela fosse sua mãe.

Eu estudei lealmente e reparto sem inveja e não escondo a riqueza que ela

encerra, porque ela é para os homens um tesouro inesgotável; e os que a

adquirem preparam-se para se tornar amigo de Deus, recomendados (a ele)

pela educação que ela lhes dá.”

Doutrina de Salomão sobre a sabedoria

(Capítulo 7, vers. 12-14).

Sumário

Sumário

Dedicatória.....	iii
Homenagem.....	iv
Agradecimentos.....	v
Agradecimento especial.....	vii
Epígrafe.....	viii
Lista de figuras.....	ix
Lista de símbolos e abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Definindo a doença.....	1
1.2 Importância do problema.....	3
1.3 O Diabetes e as alterações oculares.....	5
1.4 Estrutura e ultra-estrutura da íris normal.....	10
1.5 Alterações da íris decorrentes do diabetes.....	12
1.6 Modelos experimentais e estudos a respeito de alterações irianas.....	13
1.7 Estudos morfológicos envolvendo íris e diabetes.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Animais utilizados.....	18
3.2 Grupos experimentais.....	18
3.2.1 Grupo controle (GC).....	18
3.2.2 Grupo diabético (GD).....	19
3.3 Momentos experimentais.....	19
3.3.1Momento 1 (M1).....	19
3.3.2Momento 2 (M2).....	19
3.4 Parâmetros estudados.....	20
3.4.1Parâmetros clínicos.....	20
3.4.2Parâmetros bioquímicos.....	20
3.4.3Parâmetros morfológicos.....	20
3.5 Sequência dos tempos experimentais.....	20
3.6 Técnicas utilizadas.....	21
3.6.1Indução do diabetes experimental.....	22
3.6.2Manutenção dos animais.....	22
3.6.3Técnicas utilizadas para coleta dos dados clínico-laboratoriais.....	22
3.6.4Exames bioquímicos.....	23
3.6.5Sacrifício dos animais.....	24
3.6.6Preparo dos olhos para exame morfológico.....	24
3.6.6.1Exame histopatológico.....	24
3.6.6.2Exame ultra-estrutural.....	25

3.6.7 Documentação fotográfica.....	26
3.6.8 Análise estatística.....	27
4 Resultados.....	28
4.1 Avaliação morfológica.....	28
4.1.1 Exame histopatológico.....	28
4.1.1.1 GC M1.....	28
4.1.1.2 GC M2.....	28
4.1.1.3 GD M1.....	29
4.1.1.4 GD M2.....	29
4.2 Exame ultra-estrutural.....	29
4.2.1 GC M1.....	29
4.2.2 GC M2.....	32
4.2.3 GD M1.....	32
4.2.4 GD M2.....	33
Legenda das figuras.....	35
5 DISCUSSÃO.....	71
5.1 Quanto ao modelo utilizado para estudo.....	71
5.2 Quanto aos parâmetros morfológicos.....	76
6 CONCLUSÕES.....	84
7 Abstract.....	85
8 Referências bibliográficas.....	87
Apêndice	

Lista de figuras

Lista de figuras

FIGURA 1 :Corpo ciliar e íris de rato do GC no M1 (microscopia óptica).

FIGURA 2: Corpo ciliar e íris de rato do GD no M2 (microscopia óptica).

FIGURA 3:Corpo ciliar e íris de rato do GD no M1 (microscopia óptica).

FIGURA 4:Corpo ciliar e íris de rato do GD no M2 (microscopia óptica).

FIGURAS 5 a 8 Vasos de íris de rato do GC no M1 (microscopia óptica de transmissão).

FIGURAS 9 a 18: Vasos de íris de rato do GC no M2 (microscopia óptica de transmissão).

FIGURAS 19 a 29:Vasos de íris de rato do GD no M1 (microscopia óptica de transmissão).

FIGURAS 30 a 39: Vasos de íris de rato do GD no M2 (microscopia óptica de transmissão).

Lista de símbolos e abreviaturas

Lista de símbolos e abreviaturas

°C	graus Celsius
DMID	diabete insulino dependente
DMNID	diabete não insulino dependente
G	Grama(s)
GC	Grupo Controle
GC	Grupo Diabético
GPAA	Glaucoma primário de ângulo aberto
H	hora
HE	hematoxilina - eosina
M	Molar
M0	Momento experimental zero: dia do início do experimento, no qual foi realizado o sorteio dos ratos para os respectivos grupos experimentais e em que o diabetes aloxânico foi induzido nos animais que integraram o Grupo Diabético.
M1	Momento experimental 1: 45 dias após M0, quando foram sacrificados os 4 primeiros animais de cada grupo.
M2	Momento experimental 2: 380 dias após M0, quando foram sacrificados os 4 animais remanescentes de cada grupo.
MB	Membrana basal
mg%	Miligrama(s) por cento
mg/kg	Miligrama(s) por quilograma
min	minuto
ml	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
RD	Retinopatia Diabética
pH	Logarítimo decimal do inverso da atividade dos íons hidrogênio em uma solução
X	Magnitude de aumento à microscopia

RESUMO

Resumo

O **objetivo** do presente estudo foi avaliar a presença de alterações morfológicas nos vasos irianos de ratos normais e diabéticos aloxânicos.

Material e Método: Foram utilizados 16 ratos da raça Wistar, divididos em 2 grupos experimentais: grupo controle (GC) e grupo diabético (GD). A indução do diabetes foi feita por injeção endovenosa de Aloxana. Os animais foram acompanhados com avaliação clínica e exames laboratoriais durante todo o período experimental, tendo sido sacrificados em 2 momentos: M1(1 mês) e M2 (12 meses) após o início do seguimento. Estudou-se os vasos irianos sob microscopia óptica e eletrônica de transmissão.

Resultados: A avaliação morfológica do GC mostrou que os ratos apresentaram espessamento da membrana basal nas células endoteliais e pericitos assim como aumento dos corpos densos principalmente no M2. Os animais do GD apresentaram alterações nas células endoteliais, pericitos, células musculares e fibroblastos perivasculares. Os pericitos, assim como as células musculares, estiveram mais alteradas que as células endoteliais. Todas as alterações foram mais freqüentes no M2, sendo mais importantes nos animais do GD.

Conclusões: Os vasos da íris de ratos apresentam alterações decorrentes da senilidade. Alterações semelhantes ocorrem nos ratos diabéticos, que as apresentam com maior intensidade, principalmente quando a descompensação metabólica ocorre por tempo prolongado.

Descritores: diabetes experimental, rato, íris, vasos, microscopia eletrônica de transmissão.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definindo a doença

Diabetes mellitus é um grupo de doenças metabólicas, de etiologias múltiplas, caracterizada por hiperglicemia crônica, com alteração do metabolismo dos hidratos de carbono, gorduras e proteínas, resultante de defeitos na secreção de insulina, na sua ação ou de ambos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1997).

A doença já era conhecida pelos egípcios há mais de 2.000 anos. Existe no antigo “Papiro de Ebers”, que data de 1.500 a.C., a descrição de uma doença relacionada com perda de grande quantidade de urina (apud CAHILL, 1985).

O termo diabetes mellitus, ou diabete melito, foi utilizado pelos médicos gregos Aretaeus e Celsus (250 a.C.) e significa “sifão de mel” (apud CAHILL, 1985).

Em 1922, Banting e Best descobriram a insulina, permitindo o prolongamento da vida dos pacientes que, até então, não sobreviviam por muitos anos, devido ao descontrole metabólico. Com o aumento da sobrevida dos pacientes, houve também aumento dos problemas crônicos e degenerativos decorrentes da descompensação metabólica da doença diabética (FOSTER, 1998).

A doença pode ser dividida em: primária, assim chamada quando não associada a outra patologia (diabete melito insulino-dependente e não-insulino-dependente) e secundária, quando outra condição identificável provoca a síndrome diabética ou permite seu desenvolvimento (FOSTER, 1998).

O termo diabetes tipo 1 é freqüentemente utilizado como sinônimo de diabetes insulino-dependente (DMID), enquanto o tipo 2 vem sendo considerado equivalente à doença não-insulino-dependente (DMNID).

Os distúrbios metabólicos do diabetes decorrem da deficiência relativa ou absoluta de insulina e do excesso relativo ou absoluto de glucagon. Normalmente, o processo que conduz à descompensação metabólica consiste na elevação da relação molar entre glucagon e insulina (FOSTER, 1998).

O diabetes do tipo 1 ocorre por deficiência insulínica e quando a doença se manifesta, a maioria das células beta do pâncreas já está destruída (FOSTER, 1998).

Entre a população portadora de diabetes, 10% a 15% possui o tipo 1, e os pacientes usualmente são diagnosticados antes dos 40 anos de idade. Entretanto, a maioria dos pacientes diabéticos é do tipo 2 e normalmente esses pacientes são diagnosticados após os 40 anos de idade, podendo ou não necessitar do tratamento com insulina.

O processo destrutivo é provavelmente de natureza auto-imune, embora os detalhes não sejam conhecidos. Os pacientes com diabetes tipo 1 apresentam dois defeitos fisiológicos: secreção anormal de insulina e resistência à ação do hormônio nos tecidos-alvos (FOSTER, 1998).

As manifestações clínicas do diabetes melito sintomático variam entre os pacientes.

Em geral, a procura pela assistência médica ocorre devido a sintomas relacionados à hiperglicemia (poliúria, polidipsia, polifagia). Entretanto, o primeiro evento pode ser a descompensação metabólica aguda, resultando em coma diabético. Em certas ocasiões, a expressão inicial consiste de complicação degenerativa, como a neuropatia, na ausência de hiperglicemia sintomática.

A causa das complicações diabéticas não é totalmente conhecida e pode ser multifatorial. Deve-se dar maior ênfase à via do poliol, na qual a glicose é reduzida a sorbitol pela enzima aldose-redutase. O sorbitol, que parece funcionar como toxina tecidual, vem sendo implicado na patogenia da retinopatia, da neuropatia, da catarata, da nefropatia e da doença aórtica (FOSTER, 1998).

1.2. Importância do problema

Atualmente a doença diabética é encarada como um problema de saúde pública, em consequência das complicações que dela decorrem a longo prazo.

Ocorre tanto nos países desenvolvidos, como nos subdesenvolvidos. Estima-se que 14 milhões de americanos sejam portadores de diabetes melito. Porém, apenas 1 milhão e meio desses casos foram diagnosticados (AIELLO & CAVALLERANO, 1994).

No Brasil a incidência é alta. Porém, não se sabe ao certo quantas são as pessoas acometidas, calculando-se que existam mais de 5 milhões de indivíduos com diabetes, sendo que a metade desconhece ser portadora da doença (SOUZA FILHO & BONOMO, 1983).

A prevalência do diabetes na população brasileira é de cerca de 7%, sendo maior na cidade de São Paulo, chegando a 9,7% na faixa etária de 30 a 69 anos e a 13,4% entre 60 e 69 anos, semelhante à observada em vários países desenvolvidos (MALERBI & FRANCO, 1992).

Esta alta incidência e prevalência leva a grande número de potenciais portadores das complicações crônicas e degenerativas, decorrentes da descompensação do metabolismo (SOUZA FILHO & BONOMO, 1983).

A hiperglicemia crônica do diabetes associa-se a lesões, disfunções e falências, a longo prazo ou tardias, ocorrendo em vários órgãos, especialmente nos olhos, rins, nervos e vasos sanguíneos.

A neuropatia diabética pode afetar qualquer parte do sistema nervoso, com possível exceção do cérebro. Apesar de raramente constituir uma causa direta de morte, trata-se de uma importante causa de morbidade (FOSTER, 1998).

A nefropatia diabética é uma importante causa de morte e de incapacidade no diabético. Nos Estados Unidos, cerca de 50% dos casos de doença renal em fase terminal, são devidos à nefropatia diabética (FOSTER, 1998).

As alterações oculares são muito importantes e bastante prevalentes. Entre 1% e 2% da população do Reino Unido é acometida pelo diabetes (KANSKI, 2000) e calcula-se que o risco de cegueira nos diabéticos é 25 vezes maior que na população geral (KLEIN et al., 1984).

A retinopatia diabética (RD) está se tornando uma das principais causas de cegueira nos países desenvolvidos. Seu significado sócio-econômico é altamente relevante. Cerca de 60% dos diabéticos desenvolvem retinopatia após 15 a 20 anos de doença (AIELLO & CAVALLERANO, 1994).

Nos Estados Unidos, a diabetes é a segunda causa de cegueira legal, surgindo cerca de 8.000 cegos a cada ano devido a RD; calcula-se que naquele país, aproximadamente 19% das causas de cegueira sejam de etiologia diabética (KLEIN et al., 1984).

Tanto nos Estados Unidos, como na Inglaterra, cerca de 10% da população cega é diabética (CAIRD, 1967).

Essa situação tende a se agravar, uma vez que, estimativas feitas no ano de 1971, indicavam cerca de 55.000 cegos por RD nos Estados Unidos e projeções para o ano 2.000, mostravam que o número deveria alcançar 575.000 portadores de cegueira funcional. Nesse mesmo país, o número de diabéticos aumenta 6% ao ano, devendo duplicar em 12 anos e quadruplicar em 25 anos (DANTAS et al., 1989).

No Brasil, as estatísticas são insuficientes. Trabalhos apresentados no VII Congresso de Prevenção da Cegueira mostraram prevalência de olhos cegos devido à retinopatia diabética variando de 1,42% a 9,77%, (LAVINSKY et al., 1999). Dentre 138 diabéticos, 26,5% desconheciam que eram portadores de retinopatia. Entre 400 diabéticos portadores de retinopatia, 58,2% apresentaram-se já na fase proliferativa para a primeira consulta com retinólogo. (DANTAS et al., 1989).

1.3. O Diabetes e as alterações oculares

Apesar de ser a RD a patologia ocular mais comentada e estudada decorrente da doença diabética, o diabetes afeta o olho como um todo.

Nas pálpebras, há maior frequência de xantelasma, bem como quadros inflamatórios, como hordéolo, blefarite e meibomite (AIELLO & CAVALLERANO, 1994).

Pode ocorrer paralisia da musculatura extra-ocular, considerada como uma neuropatia isolada.

Na conjuntiva, podem ocorrer alterações nos vasos, tais como dilatação venosa, presença de corrente sangüínea segmentada nas veias e artérias e microaneurismas fusiformes (SOUZA FILHO & BONOMO, 1983).

A diminuição da sensibilidade corneana tem sido descrita dentro do quadro de alterações neurológicas da diabetes. Acomete ambos os olhos de forma simétrica e resulta de uma polineurite difusa do nervo trigêmio e de seus ramos. Esta ceratopatia pode estar associada à neuropatia periférica generalizada do diabetes e geralmente está associada à duração da doença e à severidade da retinopatia (BENSON, 1998; GINSBERG, 1998; KINCAID, 1998; NELSON & MARTYN, 1998).

A hipoestesia da córnea, associada à redução da produção lacrimal e à distrofia da membrana basal (MB) do epitélio, aumenta o risco de erosões recorrentes e úlceras neurotróficas de córnea (GINSBERG, 1998; KINCAID, 1998).

No cristalino, os diabéticos apresentam maior propensão à catarata senil, tanto em relação ao aparecimento quanto à maturação. Existe ainda uma catarata diabética propriamente dita, observada em pacientes jovens, em geral por descompensação aguda do metabolismo, que se caracteriza por ser sempre bilateral, iniciando-se com opacidades granulares no córtex cristalino que podem regredir com o restabelecimento da normalidade metabólica. A fisiopatologia da catarata diabética possui como fator básico a alteração do metabolismo intracristalino (SOUZA FILHO & BONOMO, 1983). O excesso de glicose presente no humor aquoso, por ativação da aldose-reductase, leva à formação de sorbitol que, por gradiente osmótico, permite a entrada de água e sódio no cristalino, causando lesão das fibras da lente e conseqüente opacidade (SOUZA FILHO & BONOMO, 1983).

Além das cataratas, há também as alterações refrativas de origem osmótica, podendo ser este um sinal de descompensação do estado metabólico. Geralmente são miopias transitórias, de aparecimento súbito, em quadros de hiperglicemia geralmente maior que 300mg/dl (SLAMOVITS & GLASER, 1998). É também comum a melhora

transitória da acuidade visual para perto em presbítas e a ocorrência de alterações na capacidade acomodativa (AIELLO & CAVALLERANO, 1994).

A RD é a mais comentada dentre as alterações oculares, provavelmente em decorrência do risco de cegueira que está a ela relacionado. É uma complicação vascular altamente específica, ocorrendo tanto para os diabéticos do tipo 1, quanto os do tipo 2 e a duração do diabetes é um fator de risco significativo para o desenvolvimento da retinopatia. Após 20 anos de doença, quase todos os diabéticos insulino-dependentes e mais de 60% dos não-insulino-dependentes terão algum grau de retinopatia (KANSKY, 2000).

Apesar da fisiopatogenia não ser totalmente conhecida, sabe-se que a RD é uma microangiopatia que afeta as arteríolas pré-capilares, os capilares e as vênulas. O sinal mais precoce de alteração da retina consiste no aumento da permeabilidade capilar, evidenciado pelo extravasamento de fluoresceína no humor vítreo, após injeção endovenosa. A seguir, ocorre oclusão dos capilares retinianos, com formação subsequente de aneurismas saculares e fusiformes, além do desenvolvimento de derivações arteriovenosas. As lesões vasculares são acompanhadas de proliferação das células endoteliais de revestimento e perda dos pericitos que circundam e sustentam os vasos (FOSTER, 1998).

A consequência da não perfusão retiniana é a isquemia que, por sua vez, causa hipóxia retiniana. Os dois principais efeitos da hipóxia na retina são os "shunts" arteriovenosos e a neovascularização que podem ocorrer tanto na retina como no nervo óptico e na íris ("*Rubeosis iridis*") (KANSKI, 2000).

Os portadores de diabetes estariam mais predispostos ao aparecimento de hipertensão ocular e também mais sujeitos ao desenvolvimento de glaucoma que os não-diabéticos (SHIELDS, 1989).

Os tipos de glaucoma que mais se relacionam ao diabetes são o glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) e o glaucoma neovascular, sendo que o GPAA é 1,4 vezes mais freqüente na população diabética que na população não-diabética (AIELLO & CAVALLERANO, 1994).

O DM também é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de GPAA em olhos com hipertensão ocular, devido ao provável comprometimento da microcirculação da cabeça do nervo óptico (LIEB et al., 1960; BECKER, 1971). Em estudos realizados por Kass et al. (1980), Zeiter et al. (1991), e Zucca et al. (1997), pacientes portadores de GPAA mostraram-se mais susceptíveis à progressão dos defeitos glaucomatosos do campo visual que os não diabéticos.

Todavia, ainda há controvérsias a respeito da associação entre DM e GPAA (PILTZ-SEYMOUR & STONE, 1996; WILSON & MARTONE, 1996). Em estudo sobre prevalência de glaucoma, Bengtsson (1981) não encontrou associação deste com o diabetes. Anteriormente, Sjolie (1985) já criticara o valor epidemiológico de pesquisas sobre a prevalência do GPAA que não levassem em consideração, de maneira rigorosa, variáveis de importância fundamental nesta doença, como a faixa etária e a composição racial das populações estudadas.

Uma das mais sérias complicações que podem ocorrer no indivíduo diabético é o glaucoma neovascular, patologia decorrente da proliferação fibrovascular que recobre a malha trabecular. No início, o ângulo é aberto e a pressão intra-ocular pode ou não estar alta. Posteriormente, há retração do tecido fibrovascular e formação de sinéquias anteriores periféricas, com importante aumento da pressão intra-ocular. Os neovasos do segmento anterior estão, quase sempre, associados a algum tipo de doença do segmento posterior.

Segundo alguns autores, os primeiros sinais de neovascularização iriana ocorrem na borda pupilar (WAND, 1982; HENKIND, 1975). Porém, outros acreditam que o processo de neoformação vascular se inicia na raiz da íris (GARTNER & HENKIND, 1978; DRYDEN, 1965).

Após iniciado o processo de neoformação vascular, há o aparecimento de delicada trama de neovasos sobre toda a superfície iriana, com disposição mais ou menos irregular e aspecto arborizado. Os vasos irianos normais têm uma disposição radial, com raras anastomoses, sem arborização e estão sempre recobertos por alguma quantidade de parênquima iriano, sendo evidentes somente em íris de coloração clara. Já os vasos neoformados têm delicada parede que permite a visualização nítida da coluna sangüínea (GARTNER & HENKIND, 1978).

Os neovasos presentes na margem pupilar tendem a se anastomosar com os vasos do colarete para então se estenderem em direção à periferia.

No ângulo, os vasos neoformados podem ser facilmente diferenciados dos vasos normais. Estes têm uma disposição radial na periferia da íris, sempre localizados sob o estroma. Pode-se, às vezes, notar segmentos de vasos circunferenciais, localizados na raiz da íris ou sobre a faixa ciliar. Vasos normais não ultrapassam o esporão escleral. Já, os vasos neoformados, caracteristicamente, estendem-se da periferia da íris sobre a faixa ciliar, cruzam o esporão escleral e se arborizam ao atingir a malha trabecular. A partir de um vaso que atinge o trabeculado, há a formação de uma fina rede capilar que ocorre circunferencialmente até anastomosar-se com neovasos provenientes de outro tronco nutridor (ALMEIDA, 1977).

Portanto, a íris pode estar afetada no diabetes como consequência da isquemia retiniana e também fazendo parte do quadro do glaucoma neovascular.

1.4. Estrutura e ultra-estrutura da íris normal

A descrição a seguir foi feita baseando-se nos relatos de Hogan et al. (1971).

A íris é a porção mais anterior do trato uveal. Ela forma um delicado e móvel diafragma entre a câmara anterior e a posterior. É um diafragma importante nos processos visuais, já que regula a quantidade maior ou menor de luz que deve impressionar a retina. De forma circular, apresenta uma face anterior e outra posterior.

A face anterior é ligeiramente convexa, mostrando uma região situada excentricamente (zona ciliar), mais desenvolvida, e outra central (zona pupilar), mais exígua.

As zonas pupilar e ciliar estão separadas pelo colarete, correspondendo ao pequeno círculo arterial da íris.

Com o desenvolvimento, o estroma da zona pupilar se atrofia e forma as criptas de Fuchs.

A zona ciliar apresenta três zonas bem caracterizadas: zona plana, que vai desde o colarete até o primeiro círculo de contração da face anterior da íris; zona ondulada, que vai desde o primeiro círculo de contração até o mais periférico; e a raiz da íris, que vai desde a linha das criptas até a inserção da íris no corpo ciliar.

A face posterior é de coloração negra, correspondendo ao epitélio pigmentar da íris, região onde se encontra a maior concentração de pigmentos. Pequena porção do epitélio pode ser vista na borda pupilar, onde se distingue uma margem ou um contorno de coloração enegrecida, conhecida por "liseré".

A borda ciliar corresponde anatomicamente ao ponto de implantação da córnea na esclera.

A borda pupilar corresponde à pupila, que é um orifício pequeno, arredondado, que pode aumentar ou diminuir de diâmetro, de acordo com a luminosidade presente, através de atos reflexos que dilatam ou contraem os músculos da íris.

A pupila relaciona-se com a lente, apresentando-se fechada pela membrana pupilar, que é uma membrana transparente e delgada e que desaparece do 7º ao 9º mês de vida fetal.

A inervação parassimpática se destina ao músculo esfíncter da pupila. Este, por contração, fará miose. Uma raiz parassimpática vem do ramo do nervo oculomotor para o músculo oblíquo inferior. Estas fibras fazem sinapse no gânglio e são as únicas fibras que assim o fazem. As fibras pós-ganglionares passam para os nervos ciliares curtos e inervam o músculo ciliar e o esfíncter da pupila.

A inervação simpática se destina ao músculo dilatador da pupila. Este, por contração, fará midríase. As fibras simpáticas derivam do plexo carotídeo interno e alcançam o gânglio ciliar diretamente ou por meio do nervo nasociliar, havendo raramente uma raiz simpática separada. Estas fibras são pós-ganglionares (nascem no gânglio cervical superior). Apenas passam através do gânglio ciliar e, pela via dos nervos ciliares curtos, inervam o dilatador da pupila, o orbital, os músculos palpebrais e os vasos sanguíneos do bulbo do olho (DANTAS, 1983).

A íris recebe seu suprimento sanguíneo arterial do círculo arterial maior, o qual fica no estroma do corpo ciliar próximo à raiz da íris. Ramos provenientes do círculo maior penetram a periferia da íris através de sua raiz. Esses ramos ocupam o estroma iriano anterior enquanto dirigem-se ao colarete. Os ramos desses vasos, suprem o estroma e a íris

posterior. Os ramos principais finalmente formam um círculo arterial incompleto no colarete.

Os ramos do círculo arterial menor estendem-se pela região pupilar para formar arcadas capilares; estas então juntam-se às veias na região do esfíncter muscular. Ramos do círculo menor também passam posteriormente entre feixes de músculos esfíncterianos para suprir o músculo e a íris posterior. Os canais venosos da íris seguem os arteriais, sendo que as veias maiores penetram no estroma anterior e as menores, próximas ao músculo dilatador. O tronco coletor dessas veias entra no corpo ciliar, onde o sangue então drena para o sistema das veias vorticosas e o plexo ciliar (HOGAN et al., 1971).

1.5. Alterações da íris decorrentes do diabete

O diabete afeta de forma intensa o sistema vascular de todo o organismo. A úvea, a túnica vascular do olho, certamente estará sujeita a alterações. Alterações em vasos da coróide já foram evidenciadas em olhos de ratos diabéticos (RODRIGUES, 2000). Sendo a íris parte integrante da úvea, espera-se encontrar nela também a presença de marcas da doença.

O ponto mais comentado é a neovascularização iriana que ocorre no glaucoma neovascular.

Alguns autores (SIMON & FRANÇOIS, 1976) acreditam que, quando ocorre a vascularização da íris nos diabéticos, esta apresenta um aspecto bastante típico, quase patognômico e, assim, dividem a neoformação iriana em:

1- "*Rubeosis iridis*" vera, diabética ou de Salus; rubeosis primária ou pré-glaucomatosa (íris vascular diabética) que corresponde a uma neovascularização predominantemente profunda.

2- Pseudo-"*Rubeosis iridis*"; rubeose secundária ou pós-glaucomatosa (íris vascular hemorrágica), que é a imagem de uma neovascularização superficial.

3- Vascularização mista

Porém, a neovascularização iriana ocorre, em geral, nas fases avançadas da doença, quando os olhos já estão bastante alterados.

A maioria dos relatos sobre alterações irianas e diabetes pertence a olhos diabéticos em estágios avançados da doença (FRYCZKOWSKI et al., 1989; BRANCATO et al., 1994), quando as alterações podem derivar de outros problemas coexistentes, como do próprio glaucoma neovascular.

Alterações nos estágios iniciais da doença diabética não foram relatadas.

1.6. Alterações irianas em modelos experimentais em diabetes

Estudos clínicos envolvendo alterações da íris diabética mostraram que existe extravasamento de contraste em iridografias de indivíduos diabéticos (DEMELER, 1979; BRANCATO et al., 1994), indicando que esta estrutura está alterada em portadores da doença.

Avaliação morfológica mostrou que 40% dos olhos diabéticos de indivíduos que portavam a doença em estágio avançado, possuíam uma vacuolização rendilhada do epitélio pigmentar iriano, além de cerca de 85% de "*Rubeosis iridis*" e sinéquias anteriores periféricas (YANOFF, 1969).

Outros estudos, no entanto, mostraram que a íris pouco se altera em diabéticos, havendo baixa incidência de neovasos (GREY et al., 1986; ENGERMAN et al., 1982), bem como de ectrópio uveal e atrofia iriana (ARMALY & BALOGLOU, 1967).

Avaliações morfológicas em estágios evolutivos da doença seriam possíveis apenas com a realização de estudos experimentais, os quais seriam de grande valia para o conhecimento da doença e de suas repercussões.

Com a utilização de animais, é possível controlar variáveis inter-relacionadas e avaliar grupos-controle procurando elucidar pontos ainda desconhecidos da etiopatogenia do problema.

A maior limitação do uso de modelos animais é a falta de perfeita correlação entre o diabetes animal e humano. A etiologia do diabetes em muitos modelos animais é homogênea, permitindo o isolamento de um dos vários fatores patogênicos que influenciam o desenvolvimento do diabetes humano (KARASIK & HATTORI, 1994).

Apesar do diabetes espontâneo em animais ser uma ocorrência relativamente comum, a doença tem sido bem caracterizada somente em alguns poucos espécimes animais, como alguns ratos, macacos, cães e gatos (MORDES & ROSSINI, 1980).

Os pequenos roedores seriam os melhores candidatos para estudo do diabetes experimental, por terem ciclo de vida curto e custo de manutenção relativamente baixo.

Acresce-se a estes fatores, a possibilidade de trabalhar usando o rato como modelo experimental previamente estabelecido na Instituição em que o presente estudo foi desenvolvido (MACEDO et al., 1981).

1.7. Estudos morfológicos envolvendo íris e diabetes

Também com relação aos estudos morfológicos e diabetes, a retina é o foco principal, havendo vários relatos, iniciados com Kuwabara e Cogan , que descreveram pela primeira vez as alterações senis nos vasos retinianos, com perdas endoteliais e pericíticas e o desenvolvimento de aneurismas saculares em homem com mais de 50 anos de idade (KUWABARA & COGAN, 1960).

Alguns estudos ultra-estruturais realizados em ratos Sprague-Dawley diabéticos, demonstraram alterações degenerativas nos pericitos da retina, íris e coróide (DRYDEN, 1965; GARTNER & HENKIND, 1978; WAND, 1982).

Em 1969, foram relatadas alterações no epitélio pigmentar em humanos em estudo microscópico (YANOFF, 1969).

Sallmann e Grimes encontraram em ratos diabéticos, a presença de dilatação de vasos irianos, além de aumento de vacuolização do epitélio pigmentar da íris devido ao acúmulo de glicogênio (SALLMANN & GRIMES, 1971).

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

As células endoteliais de ratos diabéticos apresentam-se edemaciadas, com espessamento da MB, sendo possível observar neovasos irianos em estudos com preparações tripsínicas (BABEL & LEUENBERGER, 1974).

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

Os músculos irianos de ratos diabéticos apresentam gotas lipídicas e aumento de corpos densos, dependentes da duração e controle da doença (ISHIKAWA & UGA, 1977).

Estudo comparativo entre lesões de vasos retinianos e da íris, contrariamente ao esperado, mostraram que os pericitos não estão alterados nos animais de experimentação, como ocorre no ser humano (TILTON et al., 1986).

Portanto, alterações morfológicas na íris decorrentes do diabetes foram até o momento pouco estudadas, havendo interesse em melhor esclarecer se os vasos irianos participam de modo significativo da patogênese da doença no olho.

Assim, o presente estudo foi delineado.

Justificativa da proposta:

O presente estudo foi desenvolvido com o intuito de avaliar os vasos da íris de ratos normais e diabéticos, na tentativa de melhor conhecer a influência do estado diabético sobre esta importante estrutura ocular.

O modelo de diabetes experimental utilizado foi desenvolvido na Faculdade de Medicina de Botucatu por Macedo et al.(1981), já tendo sido empregado com sucesso em experimentos que envolveram o segmento posterior e anterior do bulbo ocular (SCHELLINI, 1992; JORGE, 1995; SPIRANDELLI et al., 1998; RODRIGUES, 2000; BOSSO, 2002).

Objetivos

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:

- ❖ Avaliar os vasos do estroma iriano de ratos normais jovens e idosos .
- ❖ Avaliar os vasos do estroma iriano de ratos diabéticos jovens e idosos .

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi delineado como um estudo experimental, de caráter prospectivo e seguiu todos os princípios para indução da doença diabética e avaliação dos animais já anteriormente preconizados pelo Grupo de Estudos do Diabete Experimental-UNESP.

3.1. ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 16 ratos da raça Wistar, de ambos os sexos, com idade de 3 meses, pesando 200 a 300 gramas (g) cada. Foram selecionados para o estudo, apenas animais sadios ao exame clínico. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu - UNESP.

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

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

3.2.1. GRUPO CONTROLE (GC) –

O grupo controle, formado por 8 ratos normais.

3.2.2. GRUPO DIABÉTICO (GD)

O grupo diabético, formado por 8 ratos diabéticos.

Para integrar o GD, os animais foram seguidos por 15 dias, após a indução do diabetes, com realização de exames clínico – laboratoriais, como descrito a seguir, no item 4. Este procedimento foi adotado para que o GD fosse constituído de animais portadores de diabetes grave.

3.3. MOMENTOS EXPERIMENTAIS

O momento zero (M0) foi o dia do sorteio dos ratos para os respectivos grupos experimentais, coincidente com o dia da indução do diabetes nos animais do GD.

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

3.3.1. MOMENTO 1 (M1) - 1 mês e 15 dias após M0

3.3.2. MOMENTO 2 (M2) - 12 meses e 15 dias após M0

Foram sacrificados 5 ratos do GC e 5 ratos do GD no M1 e no M2.

3.4. PARÂMETROS ESTUDADOS

3.4.1. PARÂMETROS CLÍNICOS

Diariamente, foram avaliados todos os animais quanto ao comportamento, atividade, aspecto geral, peso (g), ingestão hídrica (ml/24 h), diurese (ml/24 h).

3.4.2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

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

3.4.3. PARÂMETROS MORFOLÓGICOS

Os parâmetros morfológicos foram obtidos nos 16 animais, em cada um dos momentos experimentais.

No exame ultra-estrutural, foram avaliados os vasos, o espaço perivascular e o estroma da íris.

3.5. SEQUÊNCIA DOS TEMPOS EXPERIMENTAIS

- Pesagem do animal;
- Sorteio dos animais para distribuição nos respectivos grupos experimentais;

- Administração de Aloxana 2% (J.T. Baker Chemical Co.) para indução do diabetes experimental;
- Avaliação clínico-laboratorial quinze dias após a indução aloxânica. A partir de então, mensalmente;
- Observação diária do aspecto geral, medida da diurese, da ingestão hídrica, da glicosúria e da cetonúria;
- Avaliação clínico-laboratorial conforme item 4.2.
- Sacrifício dos animais previamente anestesiados, de acordo com os momentos experimentais;
- Imediata enucleação dos olhos;
- Processamento dos olhos para exame histopatológico e para exame ultra-estrutural.

3.6. TÉCNICAS UTILIZADAS

3.6.1. INDUÇÃO DA DIABETES EXPERIMENTAL

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

Previamente à indução, 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 uma 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.

Foram considerados diabéticos graves e aproveitáveis neste estudo, 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. Os animais que não preencheram esses critérios foram descartados e substituídos. Foram também substituídos os animais que morreram antes do período programado para o sacrifício.

3.6.2. 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 CR1 (Nuvital Nutrientes e Produtos Veterinários LTDA – PR.) e água "ad libitum".

3.6.3. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA COLETA DOS DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS

As avaliações clínico-laboratoriais, foram realizadas mensalmente após a indução do diabete, 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 o de água ingerida (ml/24 horas) como o de diurese (ml/24 horas);
- Foram coletadas amostras de 10 ml da urina de 24 horas para dosagem de glicose urinária (mg %);
- Foram coletadas amostras de 1,5 ml de sangue para dosagem da glicose plasmática (mg %), cortando-se cerca de 0,1 cm da ponta da cauda de cada animal;
- Após a retirada do sangue, a cauda seccionada foi amarrada com fio de algodão 2-0.

3.6.4. EXAMES BIOQUÍMICOS

- Dosagem de glicose plasmática e urinária foram 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.

- Pesquisa de glicose e de corpos cetônicos na urina: foram realizadas diariamente, 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).

3.6.5. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os animais foram colocados em cubas de vidro e anestesiados utilizando-se éter sulfúrico (Technion 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 provavelmente em função das alterações respiratórias decorrentes da toracotomia e da hipovolemia aguda, provocada pela aspiração do sangue intracardíaco.

3.6.6. PREPARO DOS OLHOS PARA EXAME MORFOLÓGICO

3.6.6.1. Exame histopatológico

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

- Secção escleral cerca de 5 mm na região do Equador, usando-se bisturi com lâmina 15;
- Fixação em solução de Bouim alcoólico (Duboscq-Brasil) por 48 horas;
- Lavagem em série crescente de alcoóis (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 h) e benzol (45 min);
- 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 (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS).

3.6.6.2. Exame ultra-estrutural

Após a enucleação, o olho esquerdo foi preparado para exame ultra-estrutural, como segue:

- Fixação em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3;
- Secção sagital do globo na região do Equador, usando-se lâmina de barbear;
- Dissecção do bulbo ocular, com auxílio de pinças, sob lupa (Karl Zeiss) com aumento de 2,0 vezes;
- Separação da úvea da esclera, com auxílio de 2 pinças delicadas;
- A íris foi separada das demais estruturas oculares, sendo colocada em frasco contendo glutaraldeído 2,5% e azul de metileno;
- Pós-fixação em ácido ósmico 1%, em tampão fosfato 0,1 M, 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 animal;
- Colocação em estufa a 60° C por 48 horas para polimerização;
- Trimagem dos blocos, sob lupa, com auxílio de lâmina de barbear;
- Cortes semi-finos, 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, para escolha dos cortes semi-finos apropriados;
- Cortes ultrafinos (500 Angstroms) feitos a partir dos cortes semi-finos escolhidos;
- Exame em microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 301.

3.6.7. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Foram obtidas, ao microscópio óptico e ao microscópio eletrônico de transmissão, micrografias da região correspondente ao estroma iriano.

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

3.6.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes aos parâmetros clínicos e laboratoriais foram submetidos a análise estatística, utilizando-se a técnica da Análise de Variância para o modelo com dois fatores (grupo e momento), tendo como procedimento paramétrico, dados apresentando características da distribuição normal de probabilidade, e procedimento não-paramétrico, na ausência destas características. Para apresentação dos resultados, considerou-se nas tabelas, a significância apontada por meio de 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

4. RESULTADOS

Os dados referentes aos parâmetros clínicos e bioquímicos, usados para comprovar a homogeneidade dos grupos de estudo, assim como os resultados dos testes estatísticos, estão apresentados em apêndice.

4.1. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

4.1.1. Exame Histopatológico

4.1.1.1. GC M1

A íris de ratos Wistar foi vista como uma fina membrana semi-transparente, contendo vasos, nervos e músculos em meio à trama de tecido conjuntivo. Os vasos estão distribuídos pelo estroma iriano de modo difuso sendo alguns de maior calibre. Posteriormente ao estroma, o epitélio da íris pode ser visualizado, e formado por células dispostas em camada única, sem a presença de pigmentos e acantocitadas sobre membrana basal (fig.1).

4.1.1.2. GC M2

A íris de ratos de GCM2 não diferiu da observada nos animais de GCM1(fig.2).

4.1.1.3. GD M1

A íris de ratos de GDM1 não diferiu da observada nos animais de GCM1(fig.3).

4.1.1.4. GD M2

A íris de ratos de GDM2 não diferiu da observada nos animais de GCM1(fig.4).

4.2. Exame Ultra-estrutural

4.2.1. GC M1

Os vasos da íris de ratos do CGM1 foram observados distribuídos por todo o estroma. Trata-se, em geral, de arteríolas e vênulas, havendo também capilares. São vasos de luz ampla, cujas paredes possuem muitas projeções , saliências e reentrâncias, constituídas por células endoteliais distribuídas em camada única, e por pericitos, dispostos de forma circular e descontínua ao redor das células endoteliais.

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

Observou-se algumas hemáceas e granulócitos na luz de alguns vasos (fig. 5).

Com relação ao conteúdo celular, observou-se que o núcleo das células endoteliais são alongados, possuem contornos irregulares, contendo cromatina mais condensada próximo à carioteca, alguns contendo nucléolo evidente (fig.5).

O citoplasma das células endoteliais é mais abundante na região próxima ao núcleo, contendo organelas como mitocôndrias redondas ou ovais, ribossomos, retículo endoplasmático liso e rugoso, complexo de Golgi, vesículas pinocitóticas e vacúolos de conteúdo eletrôn-transparente ou contendo “figuras de mielina” e corpos densos (fig.5). Em algumas células, observou-se centríolo .

Afastando-se da região do núcleo, a parede vascular é formada por segmentos mais estreitos de células endoteliais , onde existe menor quantidade de organelas citoplasmáticas (fig.6, 7).

As células endoteliais são unidas por junções íntimas ou desmossomos (fig.6), caracterizando os vasos da íris como não fenestrados .

Existem projeções citoplasmáticas das células endoteliais semelhantes a dedos-de-luva em direção à luz vascular. As projeções citoplasmáticas presentes na região de união entre células, são conhecidas por projeções filopoidais (fig.6). Algumas vezes, estas projeções estiveram unidas umas às outras em suas porções mais extremas, dando a impressão de formações em arco.

Envolvendo as células endoteliais de forma descontínua existem os pericitos que possuem núcleo de formato semelhante ao das células endoteliais, assim como organelas citoplasmáticas semelhantes àquelas (fig.6).

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

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

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

Externamente à parede vascular, existem fibras colágenas dispostas no sentido longitudinal ou transversal e os fibroblastos estromais, células que se assemelham em formato e conteúdo citoplasmático, às células endoteliais.

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

Ao redor dos vasos existe disposição concêntrica de fibras colágenas e fibroblastos, formando a adventícia vascular, que é mais frouxa próximo da parede vascular e torna-se mais densa, com as fibras colágenas orientadas preferencialmente na forma concêntrica, mais externamente (fig.8).

Próximo aos vasos pode-se observar, ainda, feixes nervosos mielinizados e amielínicos (fig.7, 8).

4.2.2. GC M2

Os vasos irianos de ratos do GCM2 apresentaram a mesma estrutura e organização celular que o observado no GCM1(fig.9).

Comparando-se animais de GCM1 com os do GCM2 foi possível observar que os do GCM2 apresentaram maior número de vesículas citoplasmáticas e de corpos densos nas células endoteliais, nos pericitos, nas células musculares e, também, nos fibroblastos (fig.10, 11, 12, 13) .

As alterações observadas foram mais freqüentes nos pericitos, nas células musculares e nos fibroblastos perivasculares. Nestas últimas células, foi possível observar gotas lipídicas no citoplasma celular (fig.14, 15).

Principalmente nas arteríolas, observou-se espessamento da MB das células endoteliais e dos pericitos.O espessamento da MB ocorreu de modo não homogêneo (fig.16, 17, 18).

4.2.3. GDM1

Os vasos irianos de ratos do GDM1 apresentaram a mesma estrutura e organização celular que o observado no GCM1.

Foram observadas nos animais deste grupo alterações semelhantes às existentes no GCM1, tais como aumento de corpos densos e vesículas citoplasmáticas no citoplasma de células endoteliais, pericitos, células musculares e também nos fibroblastos perivasculares (fig.19, 20, 21). “Figuras de mielina” e vacúolos eletrón-lucentes também foram vistos nestes animais.

Além disso, as MBs estiveram mais espessadas nos animais deste grupo (fig. 22, 23, 24, 25). O espessamento ocorreu principalmente na parede de arteríolas, quando a MB das células endoteliais, pericitos e também das células musculares foram observadas espessadas, com redução ou ausência do espaçamento entre as mesmas, havendo por vezes sinais de vacuolização da MB (fig. 26, 27, 28, 29).

4.2.4. GD M2

Os vasos irianos de ratos do GDM2 apresentaram a mesma estrutura e organização celular que a observada no GCM1.

As alterações observadas nos animais de GDM2 foram semelhantes às observadas no GDM1, porém, com maior intensidade. Assim também nestes animais foi observado acúmulo de vesículas e de corpos densos, “figuras de mielina” e vacúolos eletrôn-lucentes, ocorrendo nas células endoteliais, nos pericitos, nas células musculares e nos fibroblastos perivasculares (fig. 30, 31, 32, 33).

Muitas vezes, os pericitos apresentaram o compartimento celular preservado, porém com as organelas totalmente alteradas, reconhecendo-se as "figuras de mielina" e os corpos densos. Algumas células musculares e alguns fibroblastos perivasculares também foram visualizados como contendo organelas totalmente desestruturadas (fig. 34, 35, 36, 37).

As alterações mais importantes ocorreram nas arteríolas, assim como o foi observado no GDM1.

Principalmente nas arteríolas, mas ocorrendo também nos capilares, foi possível observar espessamento da MB das células endoteliais. O espessamento não foi

homogêneo, havendo áreas de espessamento desigual em um mesmo vaso sanguíneo. Por vezes, o espaço entre a célula endotelial e a muscular esteve "preenchido" pela MB espessa. Observou-se também, vacuolização ou cavitação da MB, principalmente nos lugares onde a mesma encontrava-se mais espessada (fig. 34, 35, 36, 37).

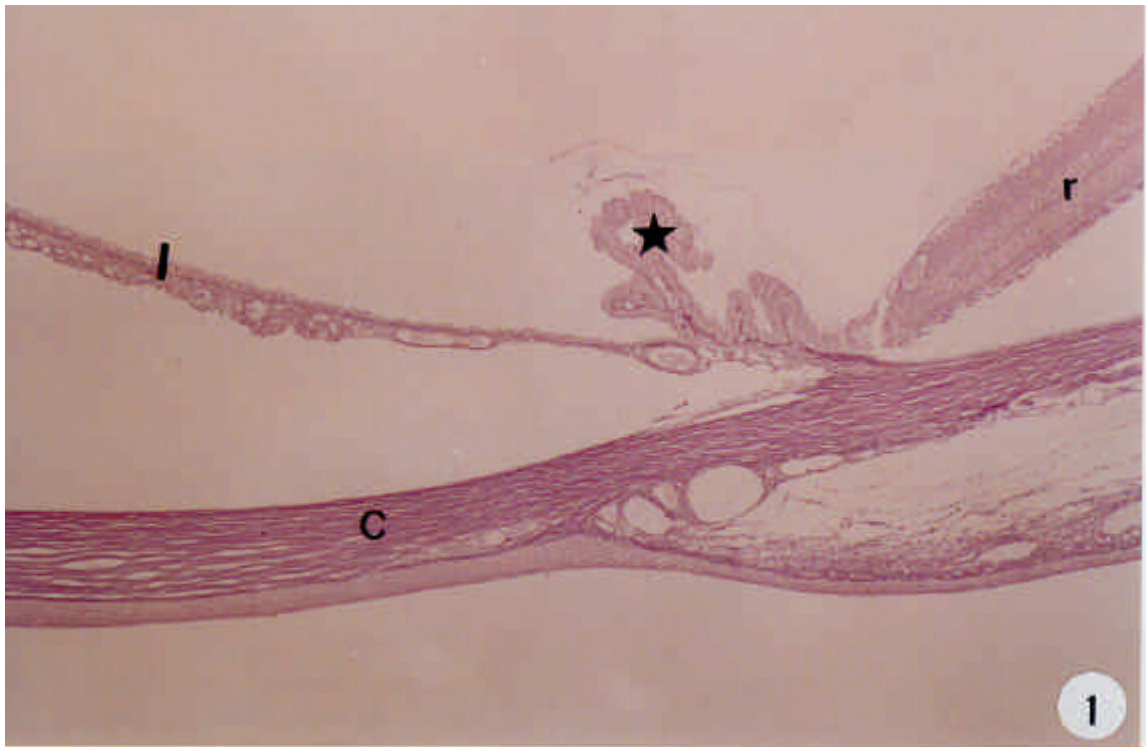
Legenda das Figuras

Legenda das figuras

MICROSCOPIA ÓPTICA

FIGURA 1: A íris (I) é uma delicada estrutura que contém o estroma rico em vasos (v) e epitélio na sua face posterior. Corpo ciliar (*) , córnea (C) . retina (r) (GCM1-PAS X 20).

FIGURA 2 : A íris (I) não difere do observado na figura 1(GCM2-PAS X 20).





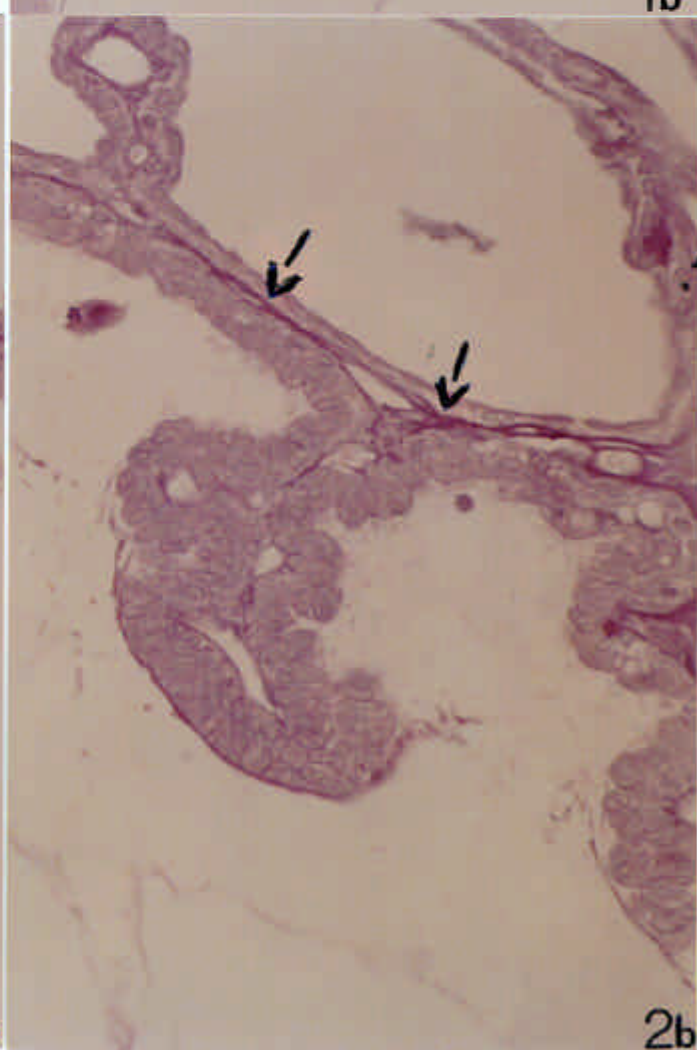
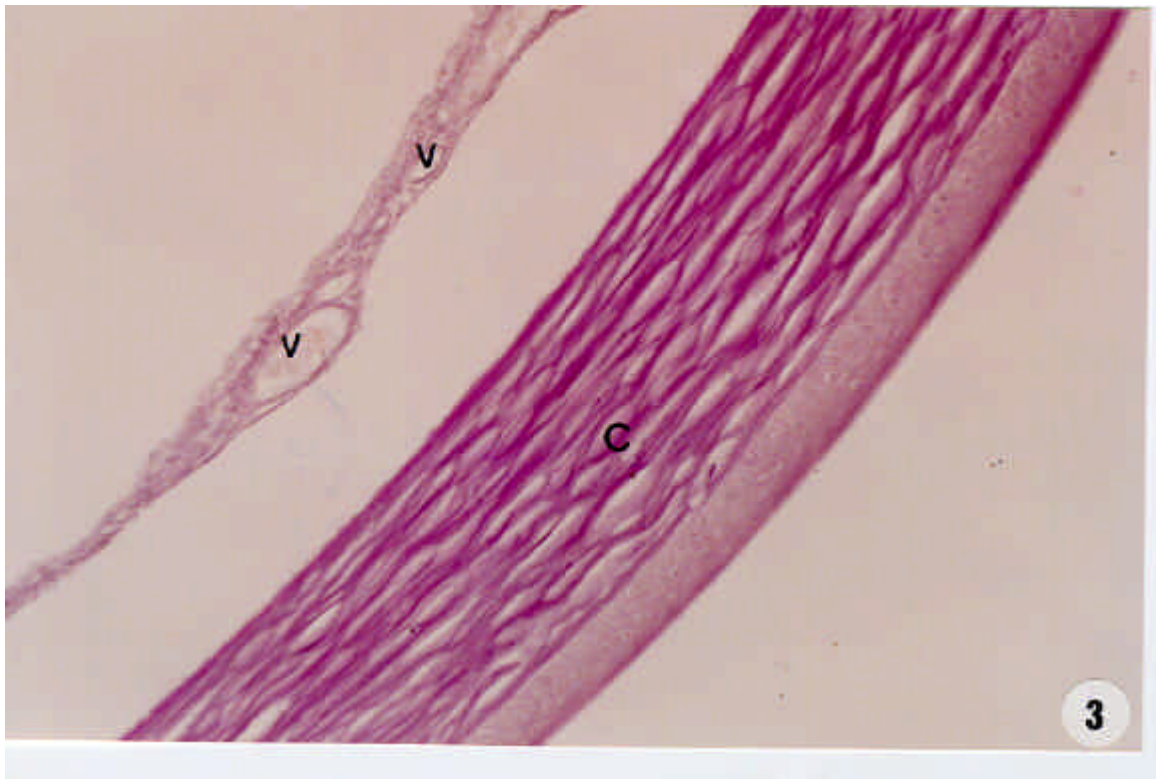
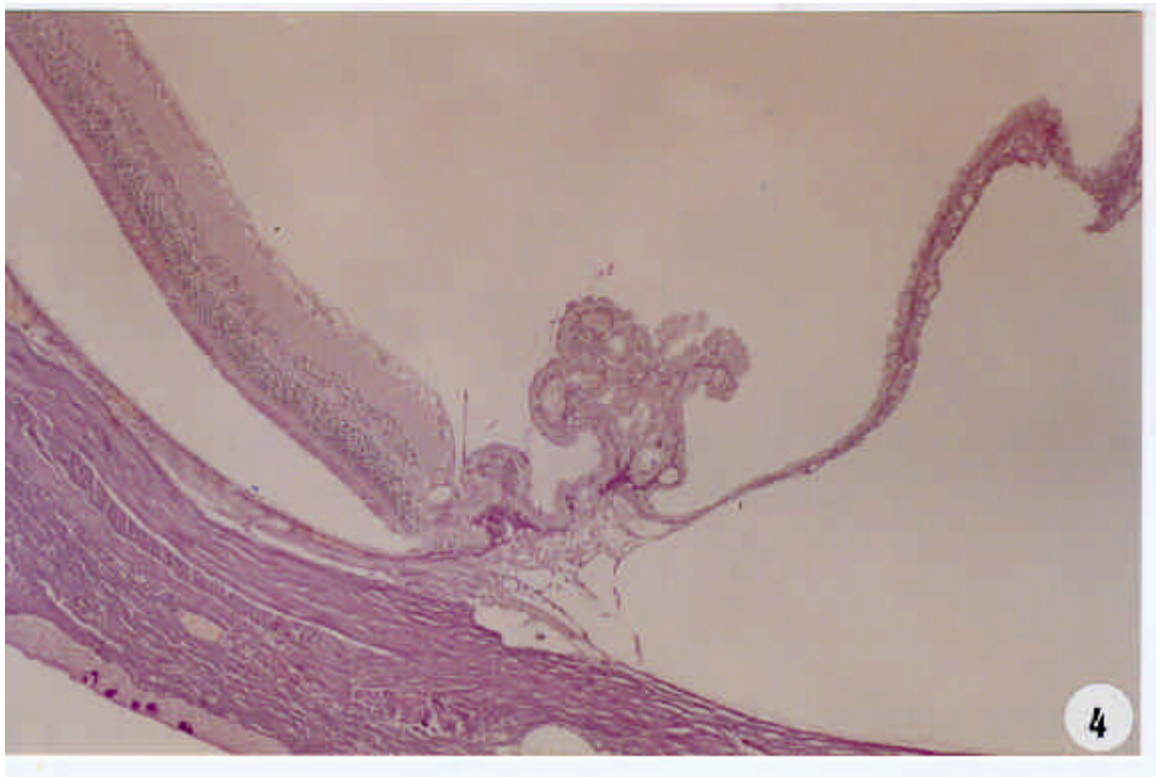


FIGURA 3: Observar detalhe da íris contendo inúmeros vasos (v).Córnea (C).(GDM1-PAS X 40).

FIGURA 4 : A íris não difere do observado nas demais figuras(GDM2-PAS X 20).





MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRASMISSÃO

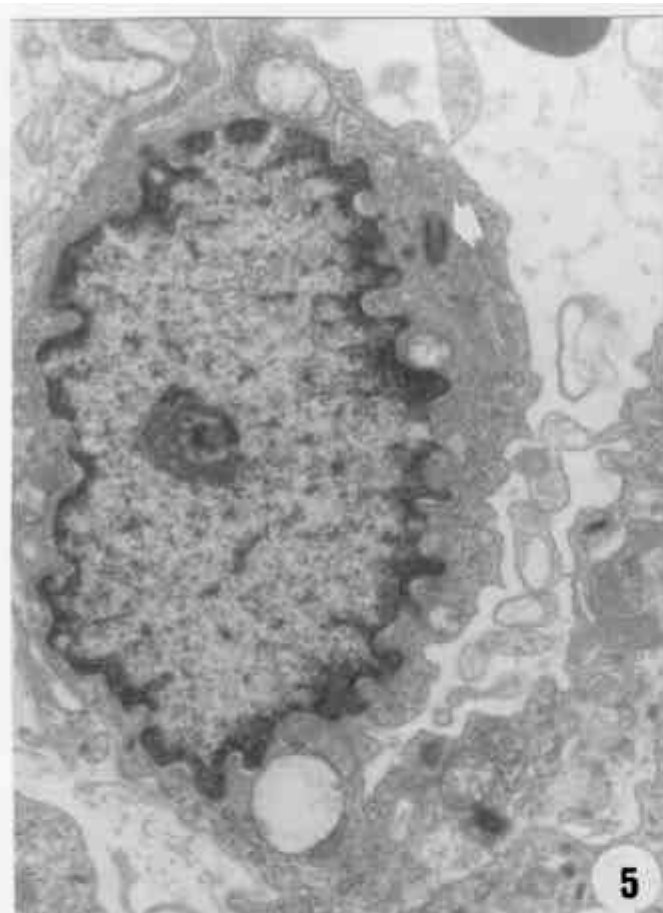
Vasos da íris de rato do GC no M1

Figura 5: Núcleo alongado contendo nucléolo. O citoplasma das células endoteliais é mais abundante na região próxima ao núcleo. (METX14500).

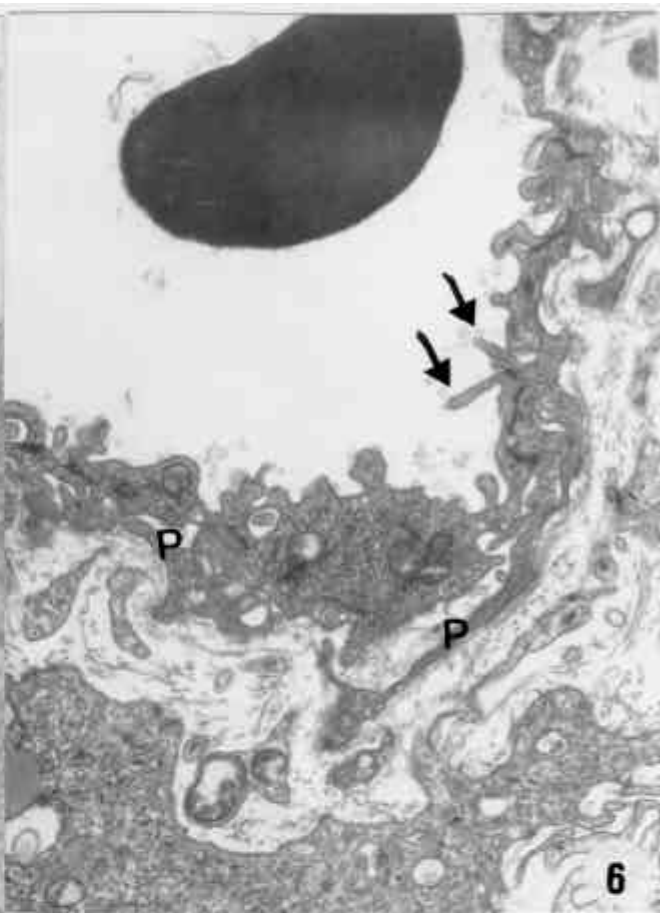
Figura 6: Células endoteliais unidas por junções selantes. Projeções filopoidais (seta). Pericitos (P). (MET X 14500).

Figura 7: A parede vascular é constituída por estreitos segmentos de células endoteliais. Feixe nervoso (N) perivascular. Hemácia na luz vascular (h). (MET X 5750).

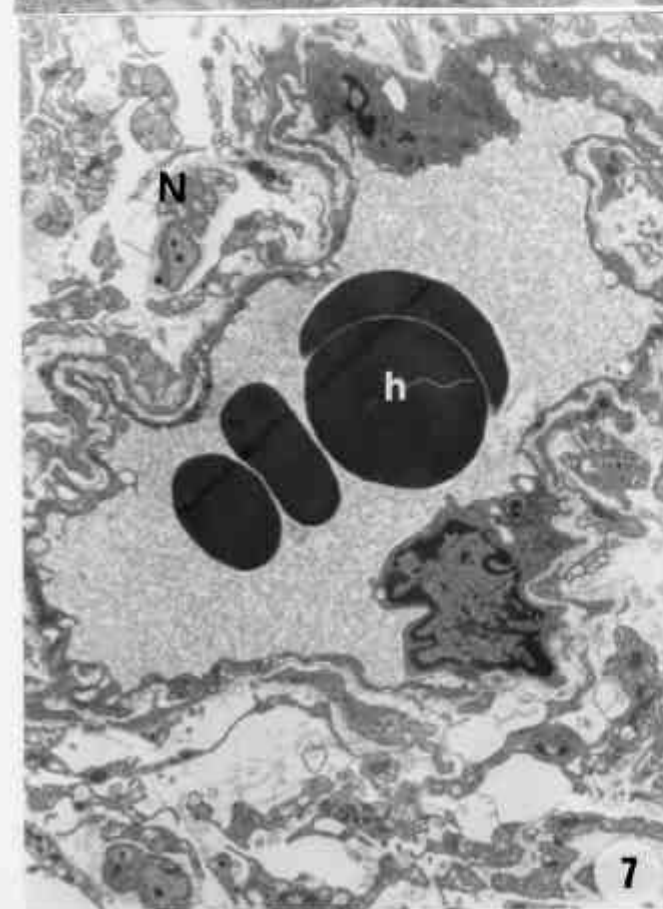
Figura 8: Núcleo (N) de célula muscular. Observar riqueza de terminações nervosas perivasculars (T). (MET X 2800).



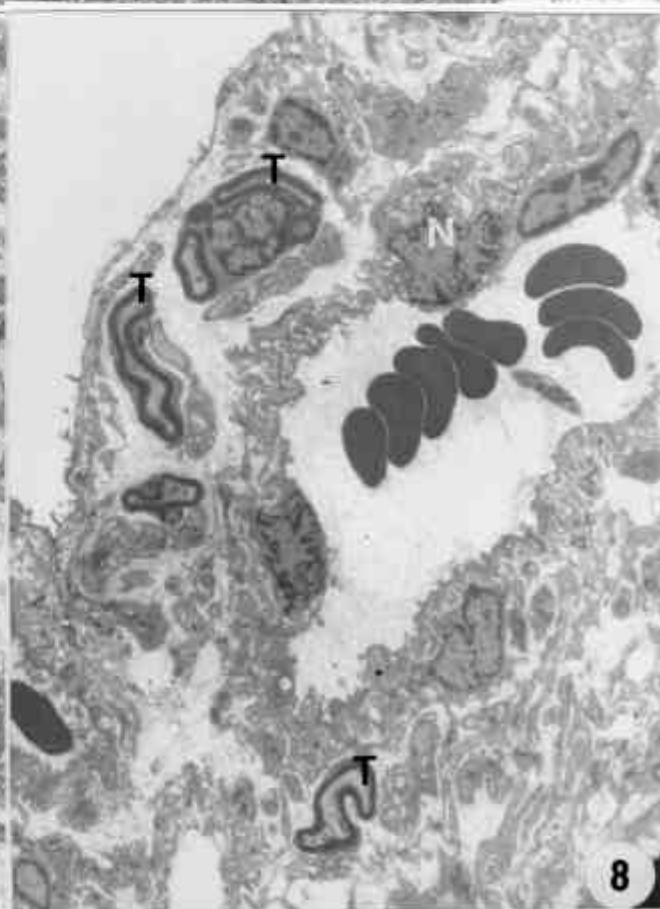
5



6



7



8

Vasos da íris de rato do GC no M2

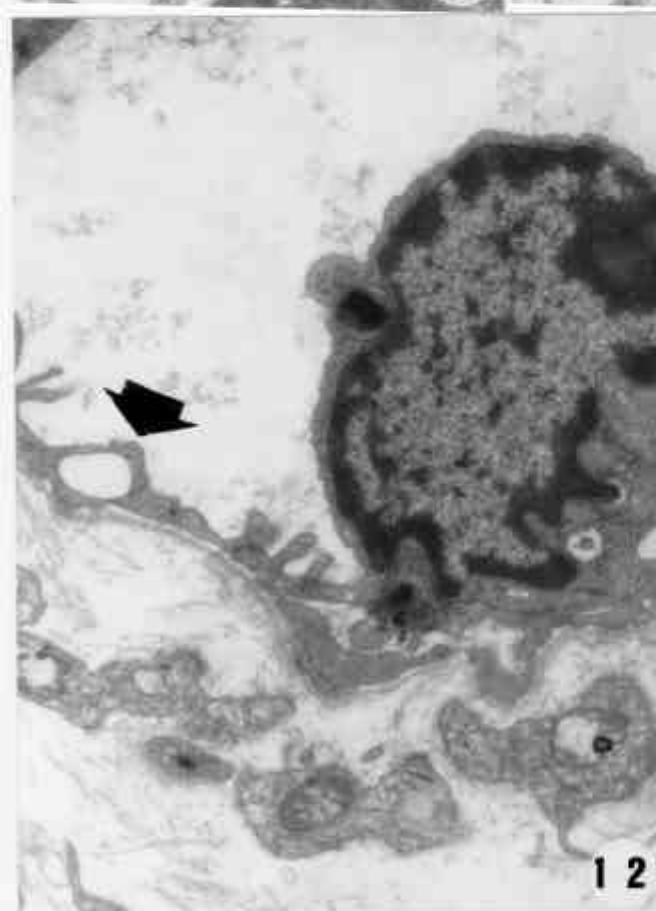
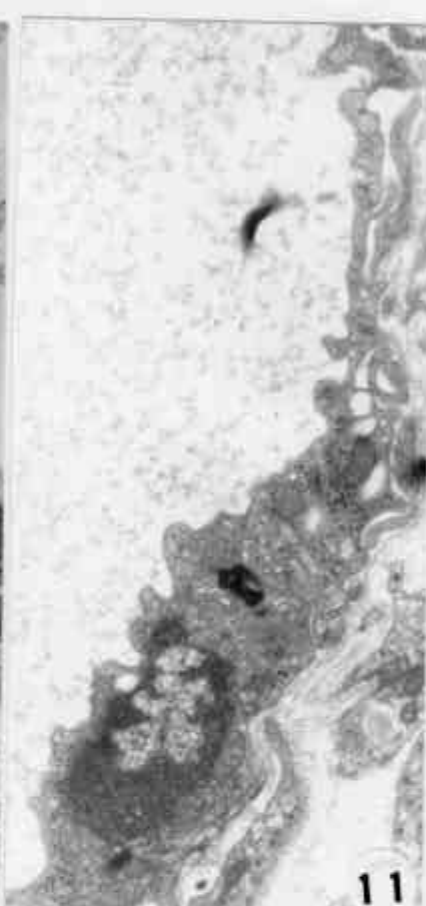
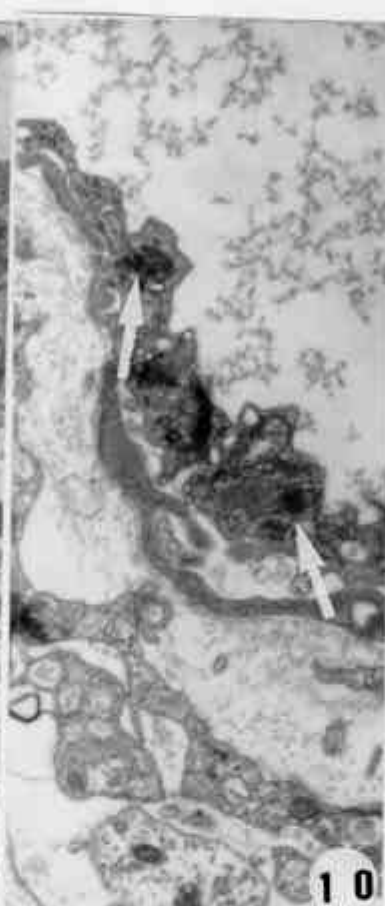
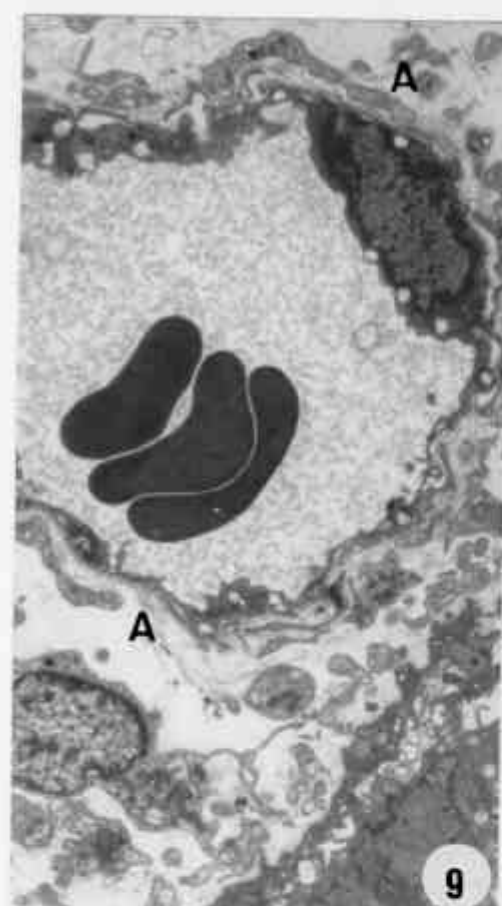
Figura 9: Adventícia perivascular (A) contendo fibras colágenas e fibroblastos estromais . (MET X 5750).

Figura 10: Células da parede vascular contém maior número de vesículas citoplasmáticas e de corpos densos(seta). (MET X 14500).

Figura 11: Células da parede vascular contém maior número de vesículas citoplasmáticas e de corpos densos ((MET X 14500).

Figura 12: Células da parede vascular contém maior número de vesículas citoplasmáticas e de corpos densos. Projeções filopoidais em arco (seta) (MET X 14500).

Figura 13: Grande número de vesículas citoplasmáticas em células endoteliais (MET X 14500).



Vasos da íris de rato do GC no M2

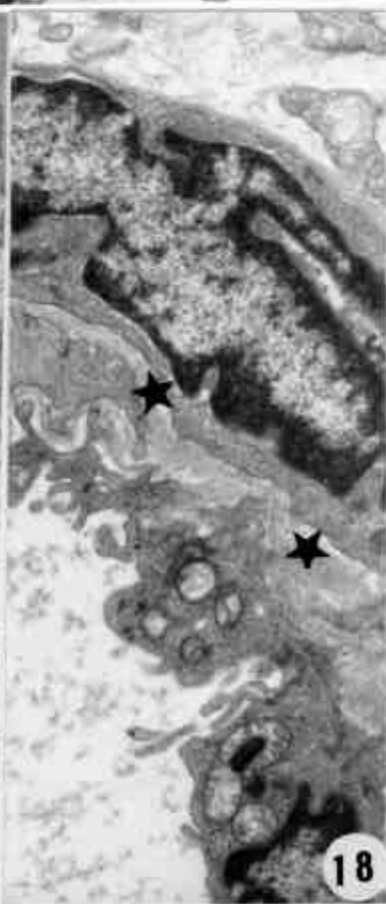
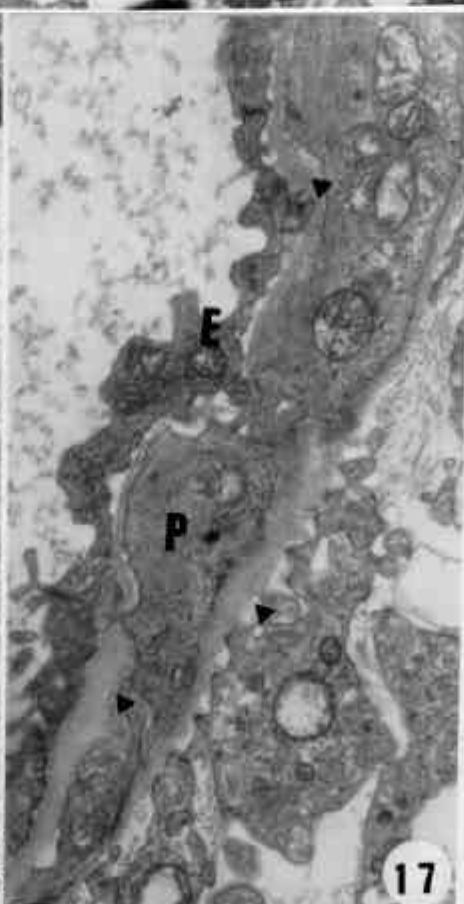
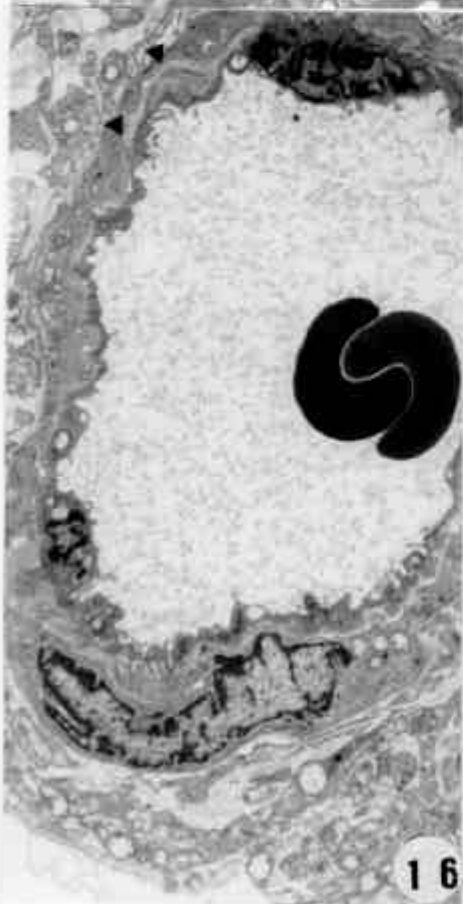
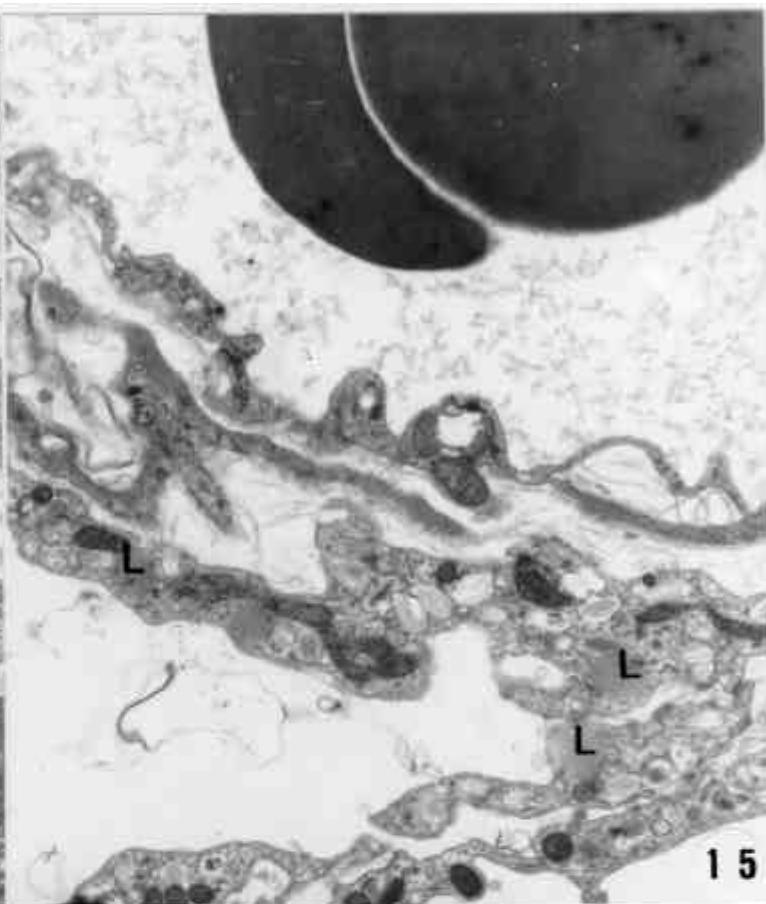
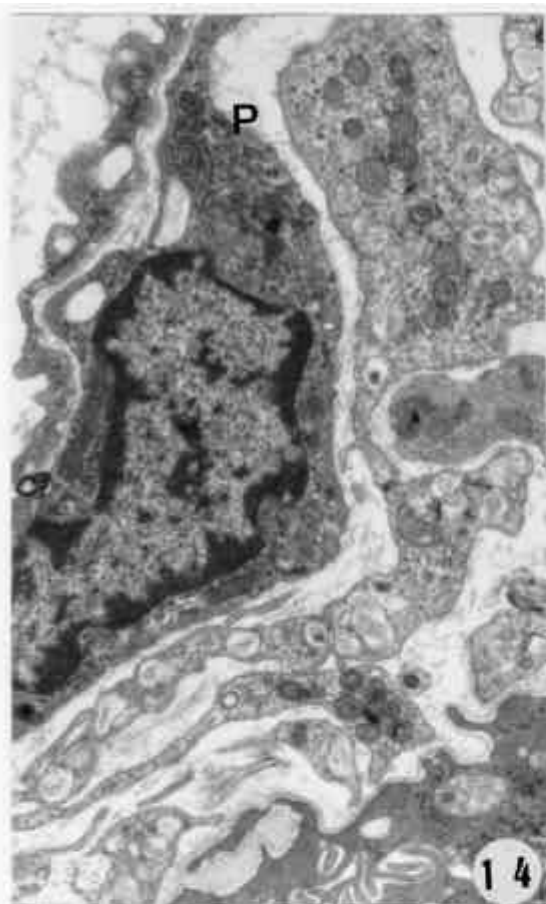
Figura 14: Pericito (P) e fibroblastos perivasculares com organelas alteradas (MET X 14500).

Figura 15: Gotas lipídicas (L) no citoplasma de fibroblasto (MET X 14500).

Figura 16: Células endoteliais e pericitos com espessamento de membrana basal (ponta da seta). (MET X 4050).

Figura 17: O espessamento da membrana basal (ponta da seta) é não homogêneo. Pericito (P). Célula endotelial (E). (MET X 14500).

Figura 18: Membrana basal espessa preenche o espaço entre a célula endotelial e pericito (★). (MET X 14500).



Vasos da íris de rato do GD no M1

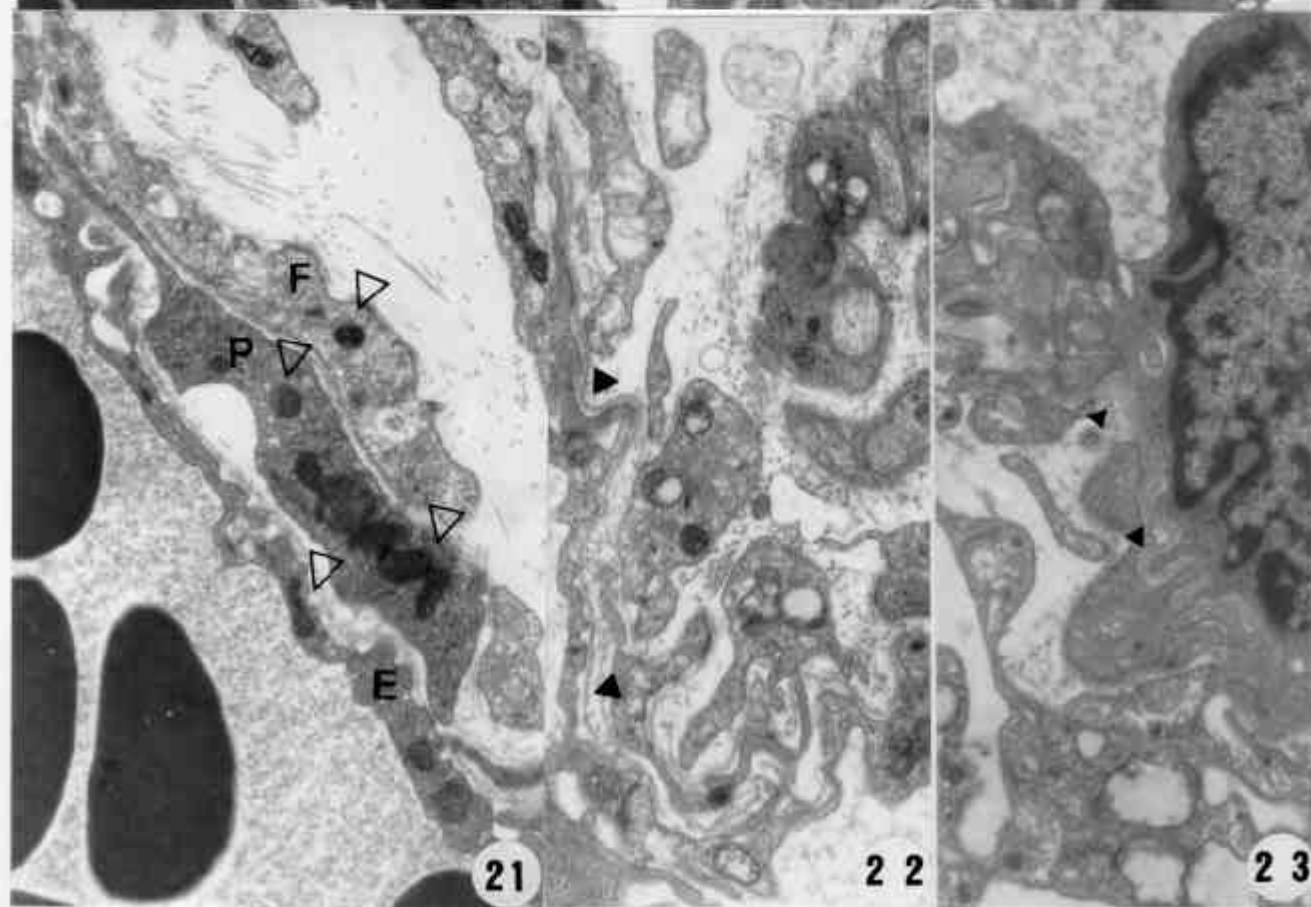
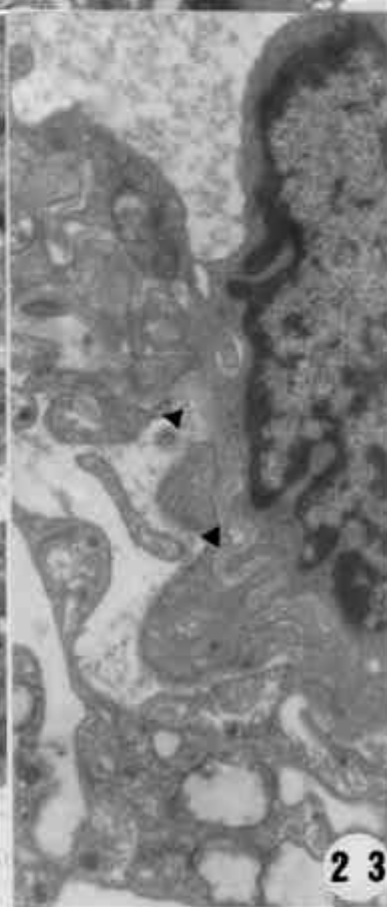
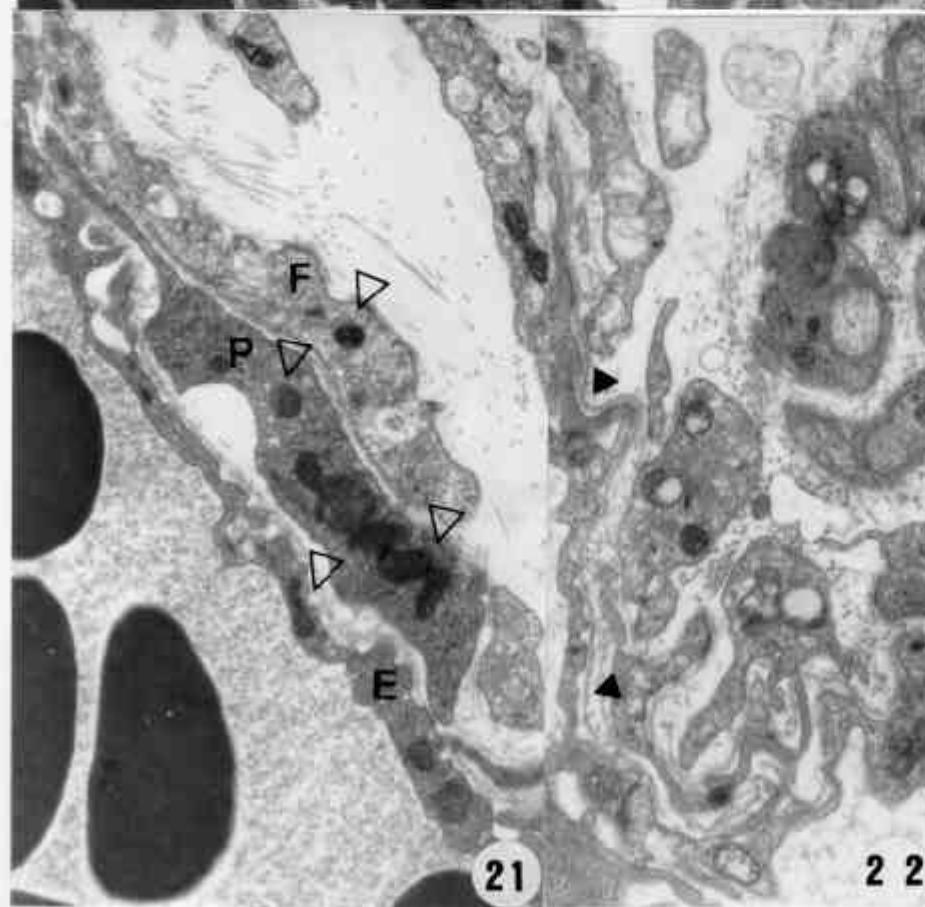
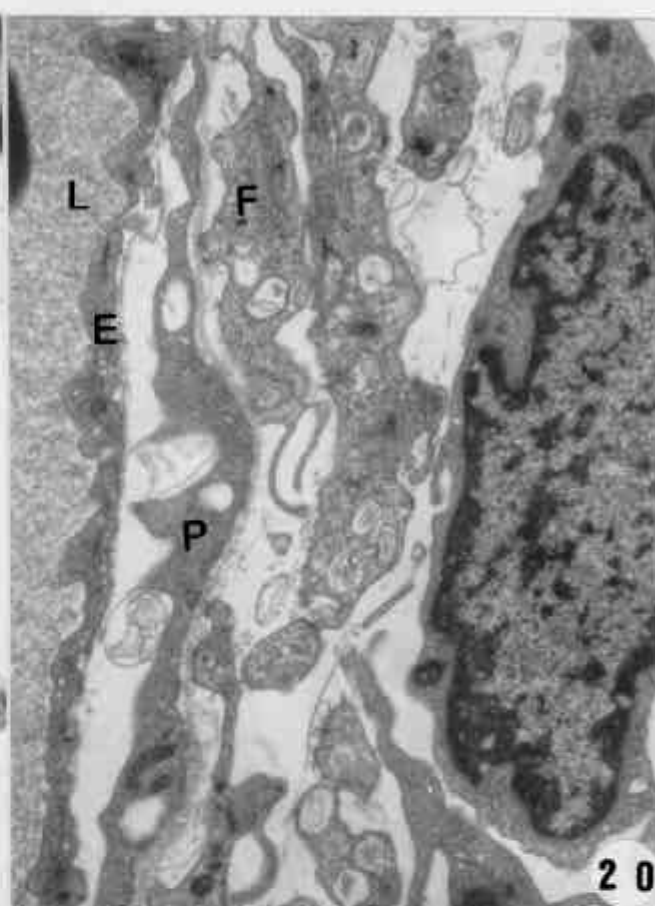
Figura 19: Aumento de corpos densos (ponta da seta) e vesículas citoplasmáticas no citoplasma de células endoteliais, musculares e também nos fibroblastos perivasculares. acúolo (seta branca) em fibroblasto. (MET X 14500).

Figura 20: Célula endotelial (E), pericito (P) e fibroblasto (F) perivascular, contendo vesículas e corpos densos. Luz vascular (L). (MET X 14500).

Figura 21: Observar os corpos densos (pontas de seta) nas células endoteliais (E), pericitos (P) e fibroblastos (F). (MET X 14500).

Figura 22: A MB (ponta de seta) nesta região não esteve espessada (MET X 14500).

Figura 23: Comparar a MB (ponta de seta) deste vaso com o da figura anterior. O espessamento não é homogêneo (MET X 14500).



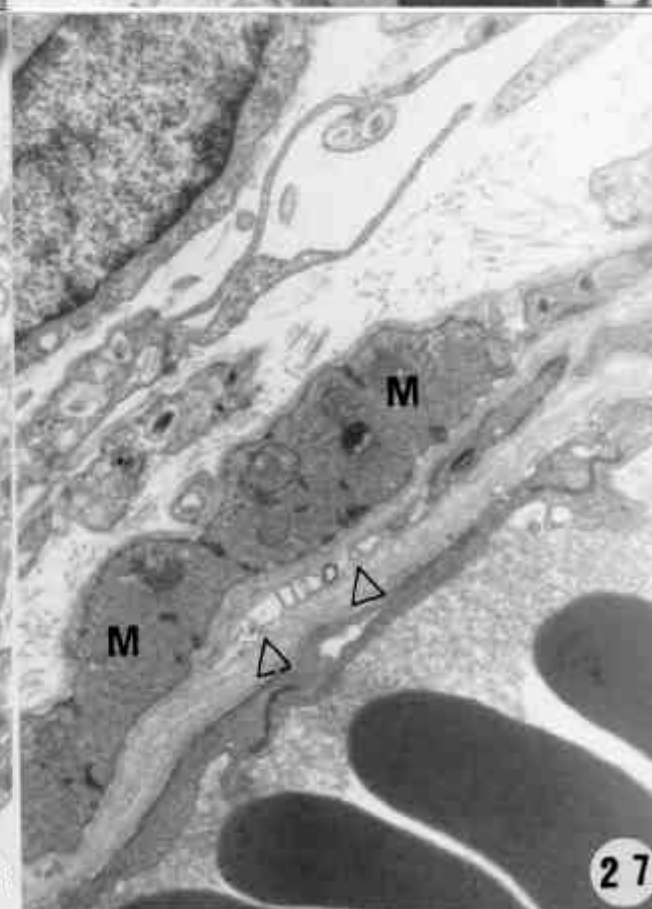
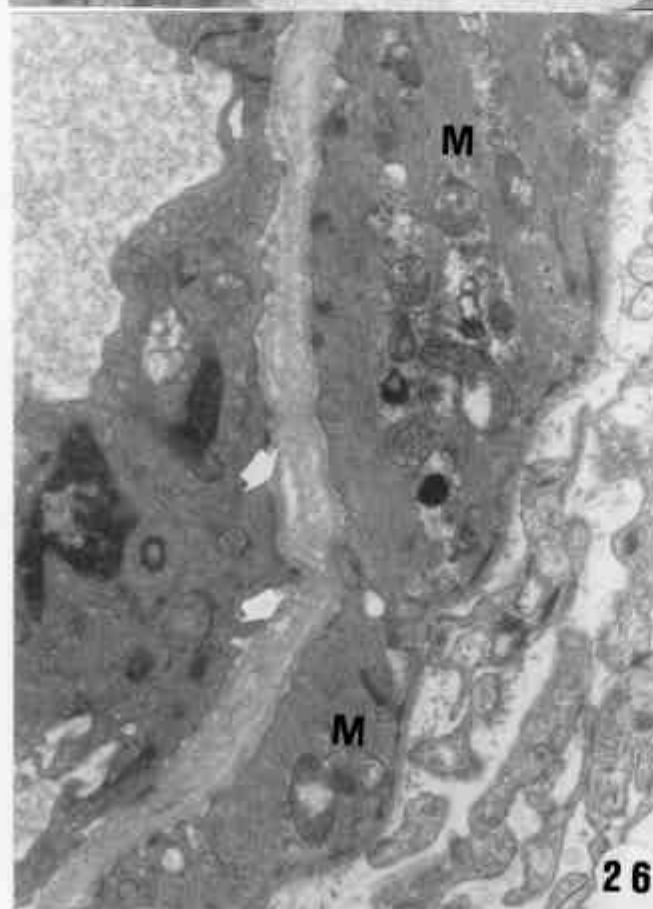
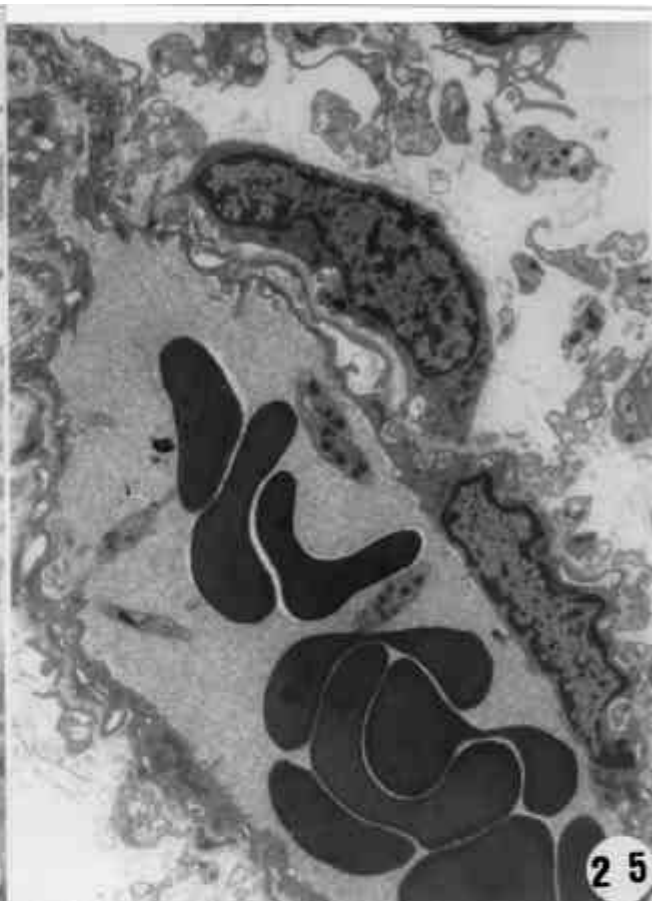
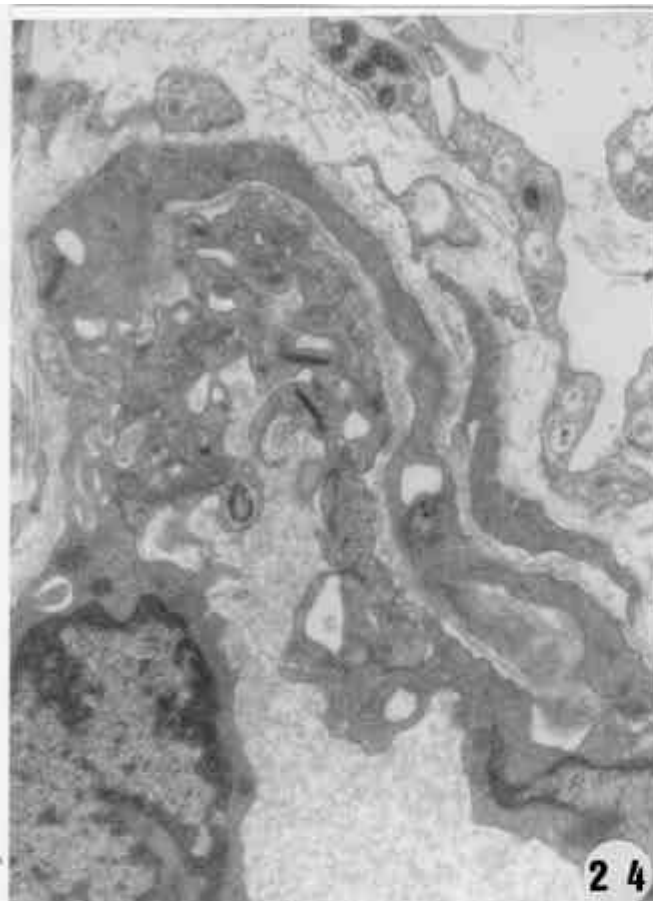
Vasos da íris de rato do GD no M1

Figura 24: Espessamento não homogêneo da MB (MET X 14500).

Figura 25: Vaso contendo hemáceas e granulócitos na luz, mostrando espessamento não homogêneo da MB (MET X 5750).

Figura 26: Espessamento e cavitação da MB entre células endotelial e muscular (M). A célula muscular exhibe miofilamentos próximo à membrana plasmática, além de corpos densos e múltiplas vesículas (MET X 14500).

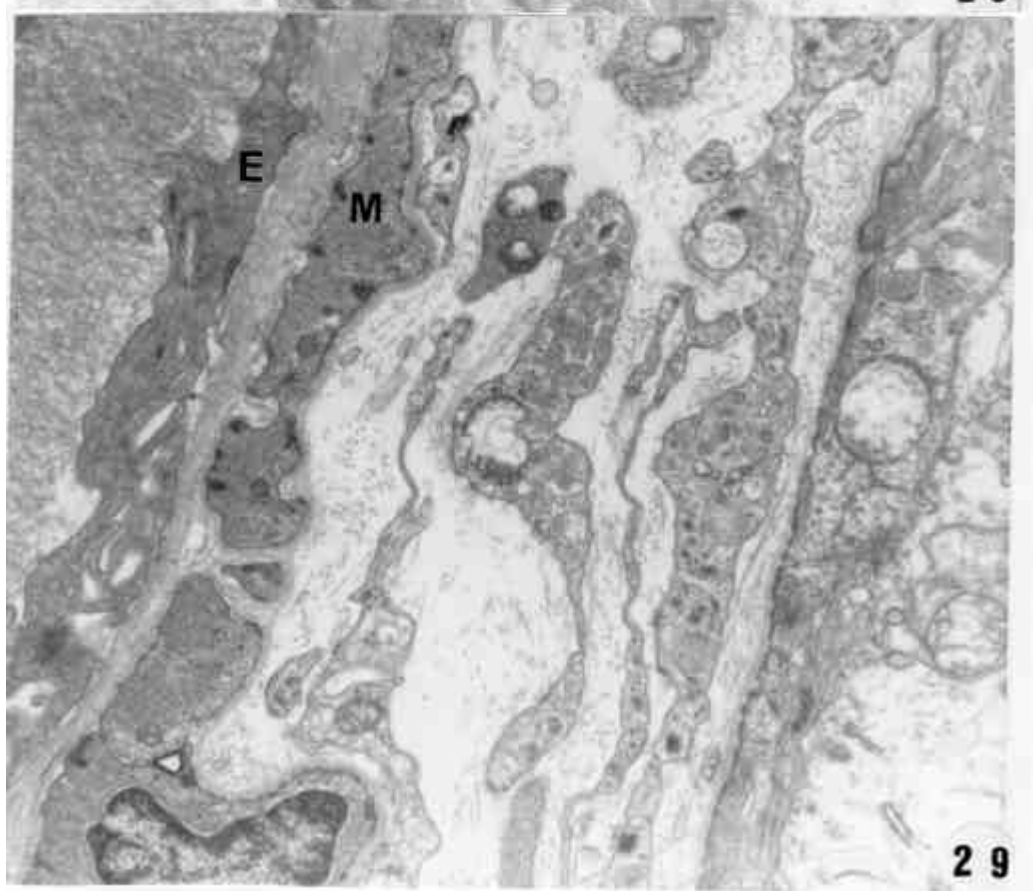
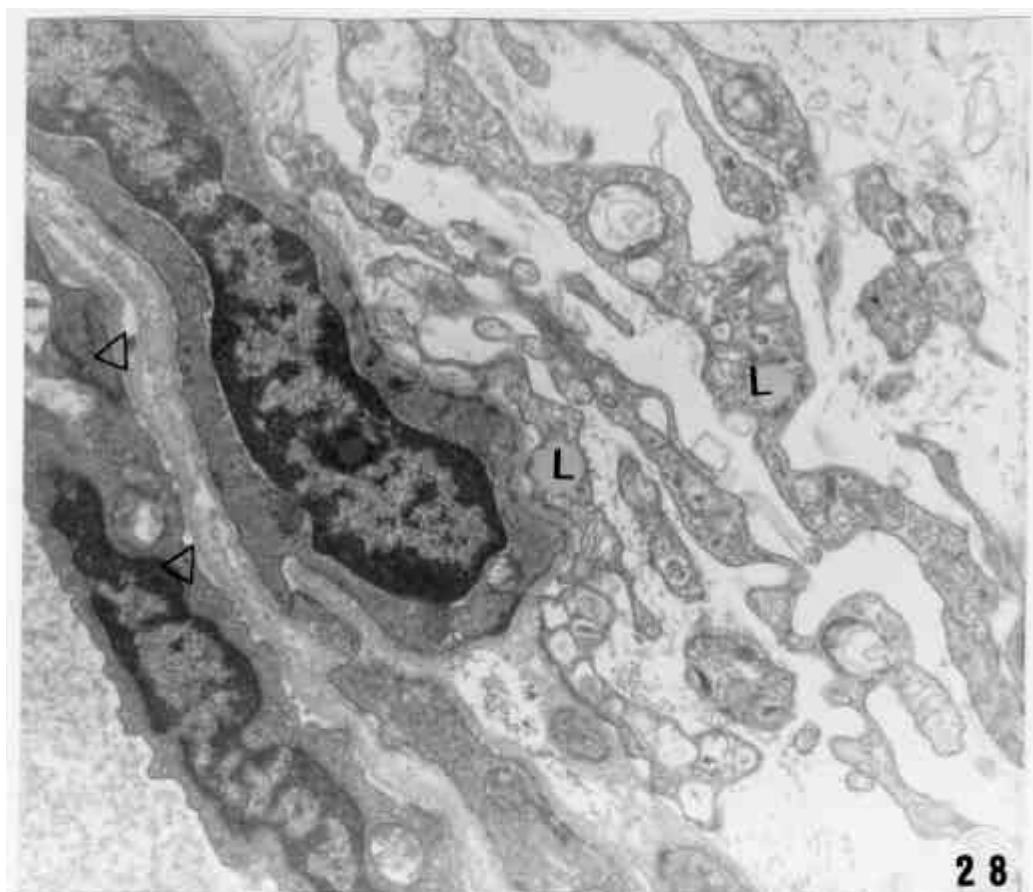
Figura 27:. Espessamento e cavitação (ponta de seta) da MB. Célula muscular (M) (MET X 14500).



Vasos da íris de rato do GD no M1

Figura 28: MB espessa e com cavitação (ponta de seta). Fibroblasto perivascular contendo lipídeo (L). (MET X 14500).

Figura 29: Célula endotelial (E) e muscular (M) com espaço entre elas preenchido pela MB espessa. (MET X 14500).



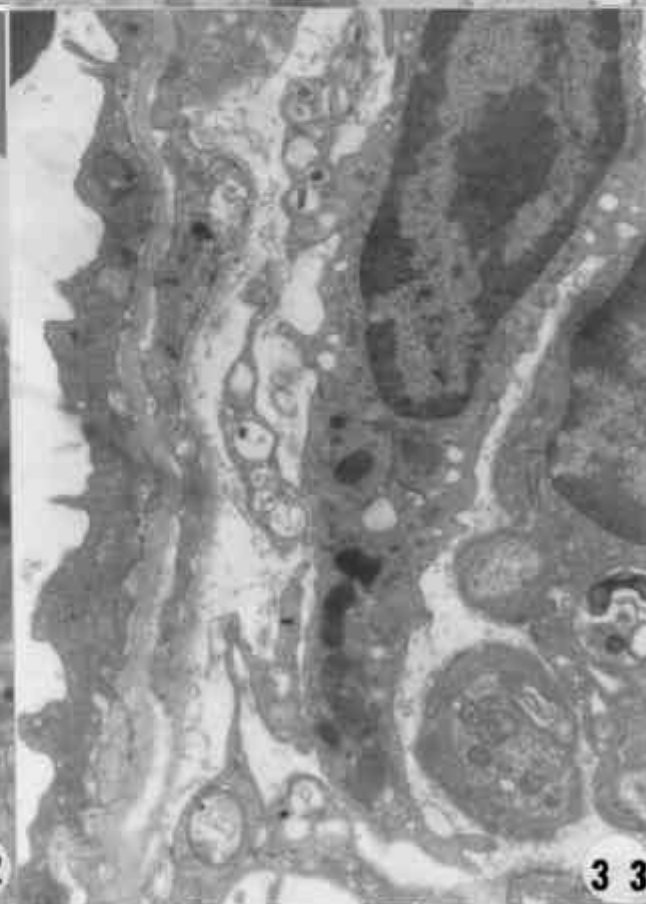
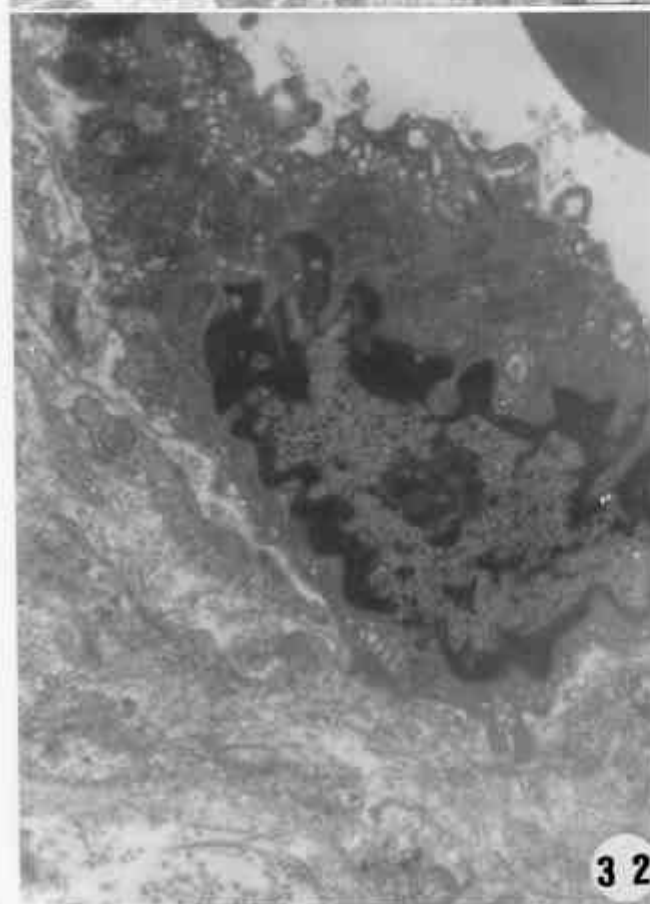
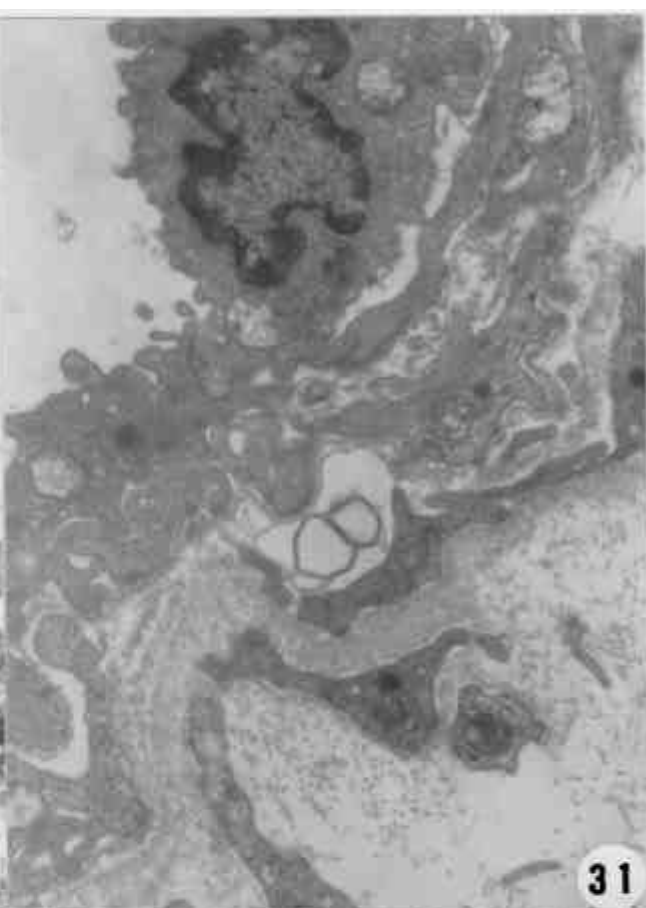
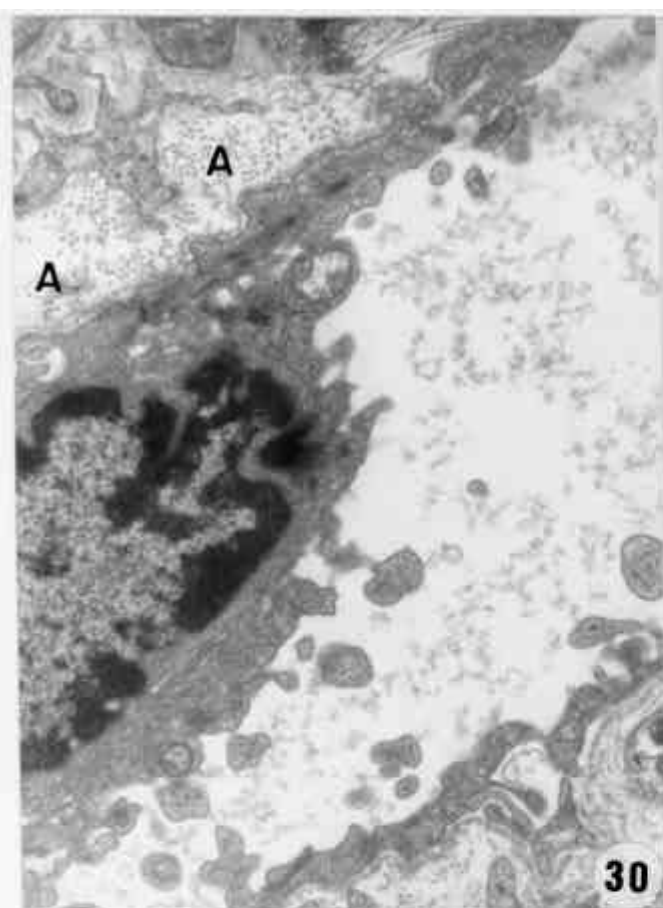
Vasos de íris de rato do GD no M2

Figura 30: Inúmeras vesículas em células musculares e endoteliais. Adventícia (A) perivascular com feixes colágenos e fibroblastos (MET X 14500).

Figura 31: Acúmulo de vesículas, corpos densos, “figuras de mielina” e vacúolos vazios nas células endoteliais, musculares e fibroblastos perivasculares (MET X 14500).

Figura 32: Célula endotelial com múltiplas vesículas (MET X 14500).

Figura 33: Acúmulo de corpos densos em fibroblasto peri-vascular. (MET X 14500).



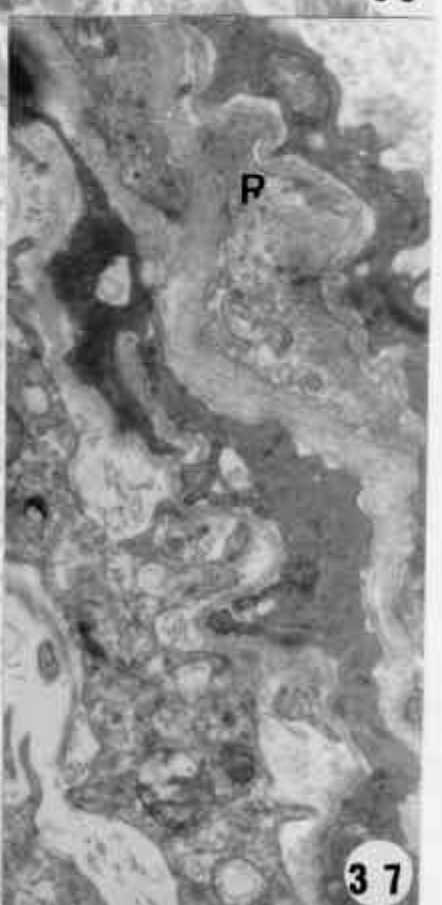
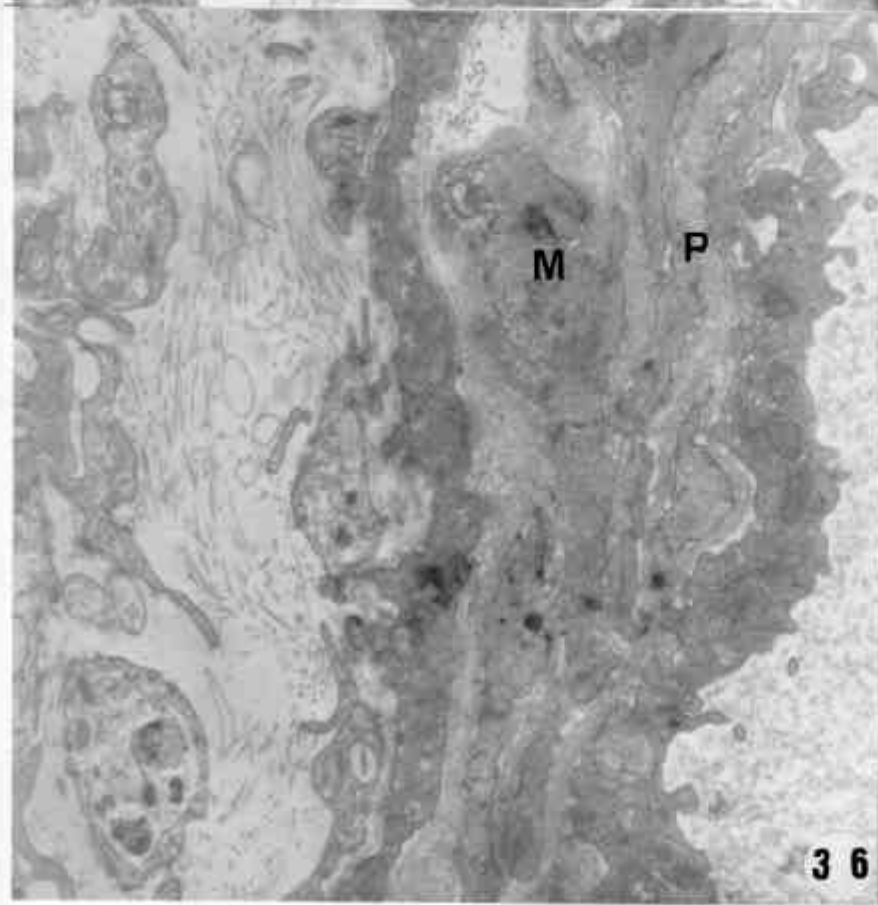
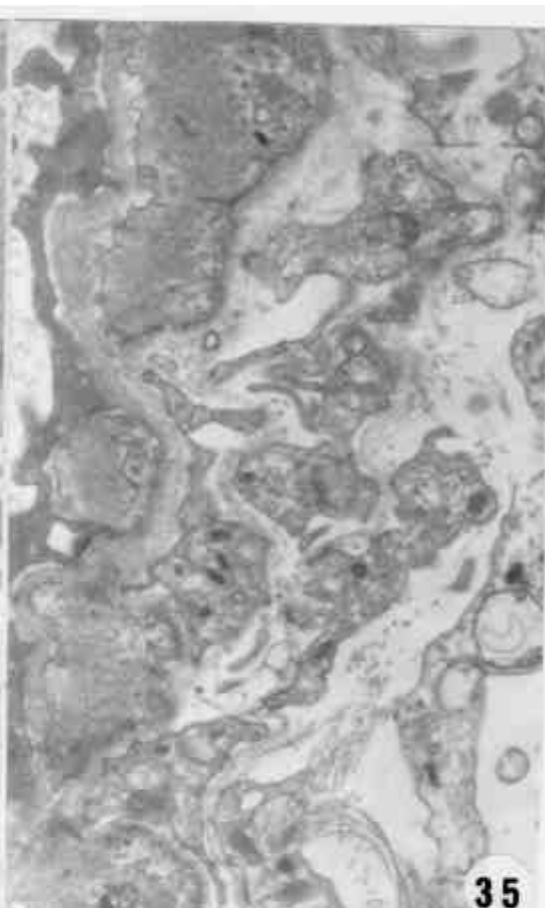
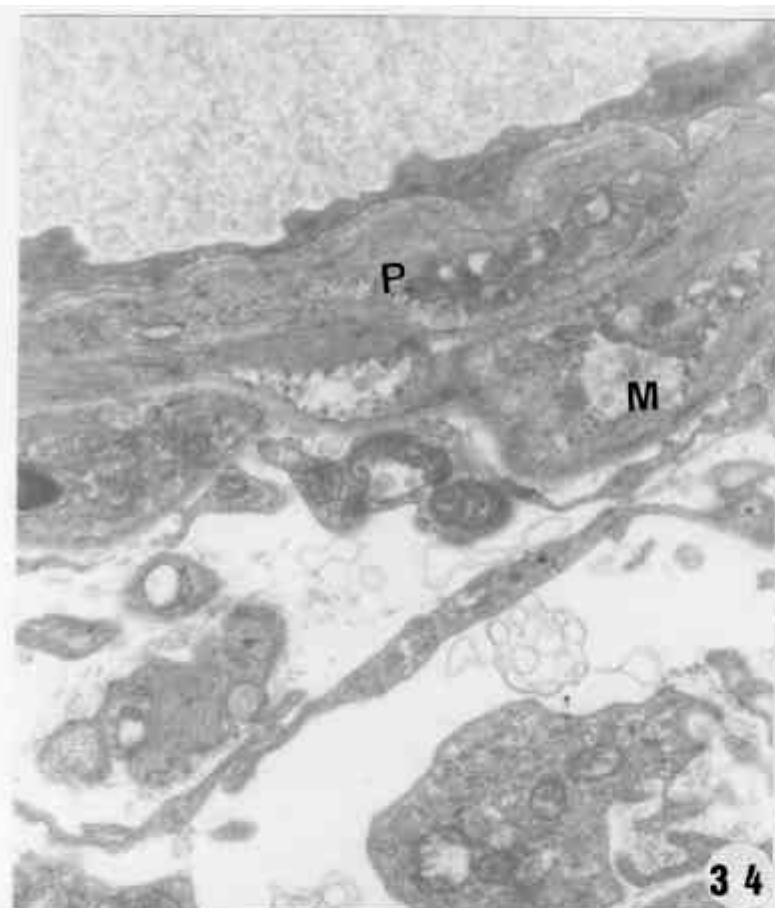
Vasos da íris de rato do GD no M2

Figura 34: Células musculares (M) e pericitos (P) contendo organelas desestruturadas e MB espessa (MET X 14500).

Figura 35: Idem, com espessamento de MB (MET X 14500).

Figura 36: Células musculares (M) e pericitos (P) contendo organelas desestruturadas, não sendo possível reconhecê-las. MB com espessamento não homogêneo (MET X 14500).

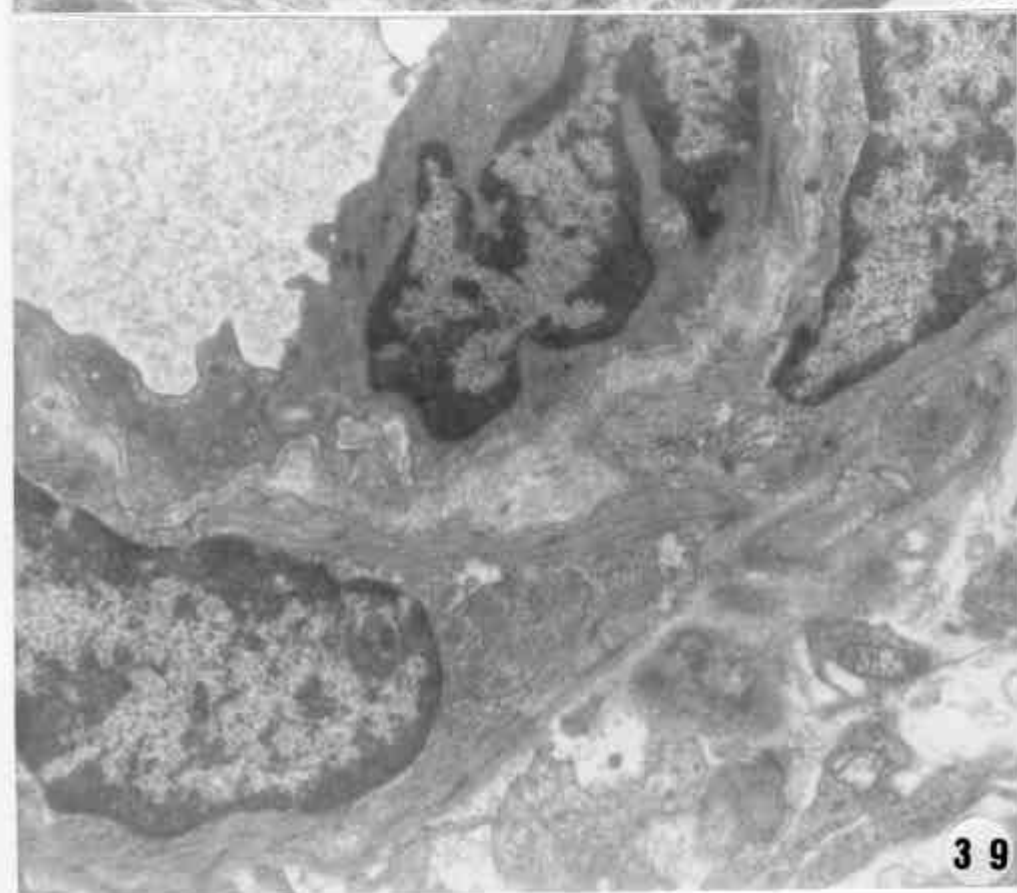
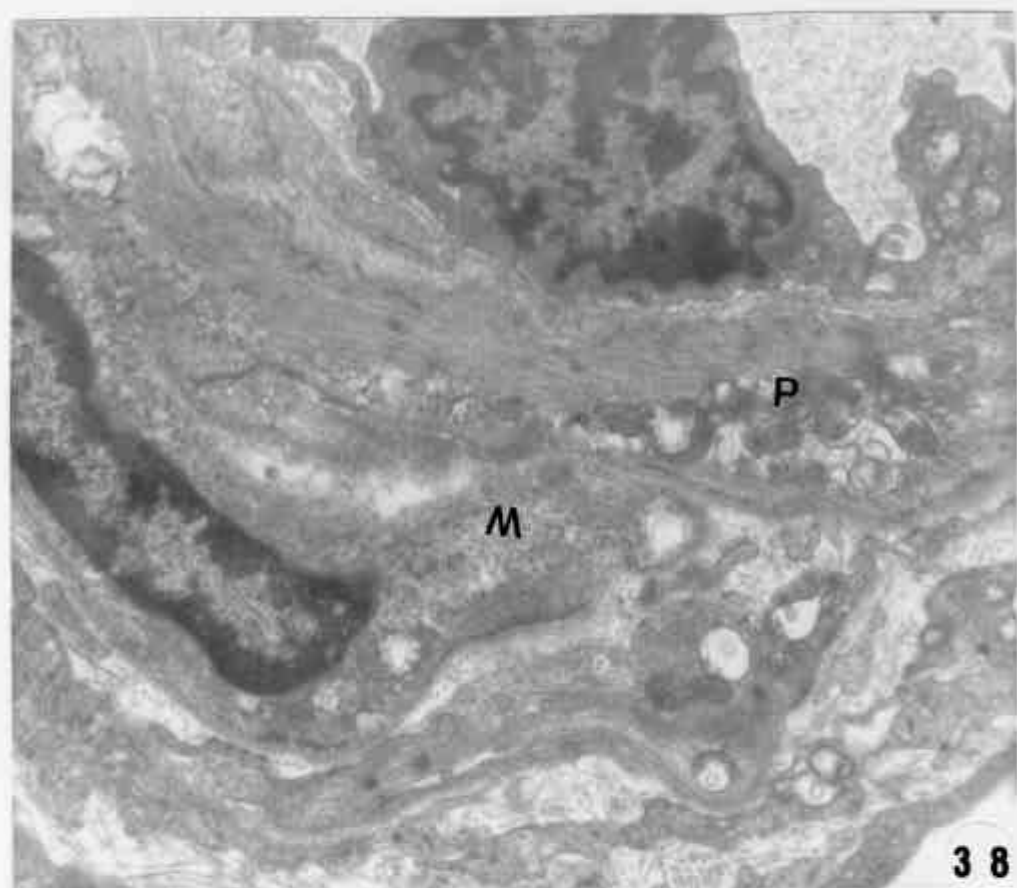
Figura 37: Idem, com espaço entre células "preenchido" pela MB espessa. Pericito (P) (MET X 14500).



Vasos da íris de rato do GD no M2

Figura 38: As células pericíticas (P) e musculares (M) são envoltas por MB espessa. (MET X 14500).

Figura 39: Idem (MET X 14500).



Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1. QUANTO AO MODELO UTILIZADO PARA ESTUDO

A dificuldade de se estudar as alterações oculares evolutivas que ocorrem no diabetes, nos fez optar pelo uso do rato como modelo experimental, apesar de que estes animais não apresentam lesões exatamente iguais às observadas em humanos, como por exemplo, não desenvolvem microaneurismas na retina em consequência da descompensação diabética (SCHELLINI, 1992).

No presente estudo, o modelo experimental utilizado foi o estabelecido por Macedo et al. (1981), baseado em Orloff et al. (1975). Inúmeros estudos anteriores realizados nesta Instituição, estabeleceram um bom domínio deste modelo experimental (MACEDO et al., 1981, 1985, 1986a, 1986b, 1987; SPADELLA, 1989; BREIN, 1990; SCHELLINI, 1992), estando totalmente determinado o modo de indução, assim como os cuidados a serem tomados para que a pesquisa seja válida.

Utilizou-se, então, a Aloxana, um derivado do ácido úrico que destrói as células beta do pâncreas, provocando diabetes de longa duração em muitas espécies de animais (DUNN et al., 1943). O tipo de diabetes induzido é o do tipo 1 ou insulino-dependente, uma vez que, com a destruição das células beta, o pâncreas não produz mais insulina. Outra droga que é bastante usada para indução do diabetes é a Estreptozotocina (ROBISON et al., 1983). Porém, o preço desta última é muito superior ao preço da Aloxana, razão da nossa escolha.

Existem cepas de animais que possuem diabetes espontaneamente (GIBBS et al., 1969; PATZ & MAUMENEE, 1962). São animais caros, que devem ser criados com cuidados especiais, dificultando a sua utilização. Pode-se empregar, ainda, dietas especiais que tornam o animal hiperglicêmico (ROBISON et al., 1983).

O modelo empregado necessita de realização dos exames laboratoriais para se definir qual é a intensidade de lesão pancreática que ocorreu, com a injeção endovenosa da Aloxana, uma vez que, diferentes respostas à droga são possíveis, desde não desenvolver diabetes até morte por alteração metabólica muito exacerbada (SPADELLA, 1989).

Em decorrência destes fatores, há necessidade de se acompanhar os animais por um período para se identificar se a doença foi induzida e com qual intensidade, procurando-se ter apenas animais portadores de diabetes grave nos grupos experimentais. O tempo estipulado para definição da inclusão no estudo é de 15 dias. Mesmo depois dos primeiros 15 dias, considerados necessários para a estabilização da glicemia nos níveis compatíveis com o diabetes grave, alguns animais podem ter alterações importantes, chegando mesmo à reversão do quadro de diabetes para a normalidade (SPADELLA, 1989).

Desta forma, quando se trabalha com o rato no qual se induziu quimicamente o diabetes, há necessidade de se realizar rigorosamente exames periódicos, como descrito no capítulo Material e Método e efetuado neste estudo, estando os dados de acompanhamento dos animais constantes do apêndice, uma vez que este não era objetivo do estudo, mas necessidade para validação do modelo experimental.

Outro problema que existe quando se utiliza este modelo experimental é que os animais podem morrer antes da época idealizada para o sacrifício. Logo após a indução da doença, é grande o número de animais que morrem. Este fato ocorre por se ter

descompensações importantes do metabolismo, conforme ressalta Spadella (1989) que observou óbito em 38,9% dos animais até o 14º dia após a indução do diabetes.

Sendo assim, o número de ratos em seguimento deve ser sempre superior ao que se pretende estudar, visando a reposição dos animais mortos e também dos que tiveram a reversão do estado diabético.

Em vez de substituir os animais mortos ou os que tiveram a reversão do estado diabético, outro caminho seria continuar a pesquisa apenas com os animais que sobrevivessem e que mantivessem o diabetes induzido nos níveis desejados. Porém, haveria o risco da amostra não ser representativa. Assim, optou-se por ter os grupos com o mesmo número de participantes até o final do experimento, realizando a reposição dos animais que, por qualquer motivo, não satisfizessem os parâmetros necessários.

Portanto, devido à possibilidade de mudanças importantes no metabolismo do rato portador de diabetes aloxânico, existe a necessidade de exames periódicos dos animais. Assim, os ratos foram seguidos observando-se os seguintes parâmetros: o estado geral, o apetite, a atividade, o peso, a ingestão hídrica e alimentar e a diurese.

A simples observação dos animais já permite diferenciar os grupos de estudo. Os animais diabéticos apresentavam o comportamento e o aspecto físico bastante diferente dos observados nos animais normais. A pelagem dos animais diabéticos era mais amarelada, com perda do brilho normal e era freqüente a presença de pediculose. Os animais diabéticos eram mais apáticos, não se limpavam e não procuravam a comida. Quando manipulados, apresentavam dor.

Era necessário que os ratos do GD apresentassem durante todo o período de estudo, os achados característicos do diabetes, como hiperglicemia, glicosúria, poliúria, polidipsia e polifagia.

Os animais diabéticos apresentaram peso inferior ao dos ratos normais. A perda de peso em animais diabéticos, resultado do aumento do catabolismo, já foi amplamente relatada na literatura científica (LEE et al., 1971; ORLOFF et al., 1975; UEDA et al., 1979; BREKKE et al., 1980; MORDES & ROSSINI, 1981; ROSSI & HELDSTAB, 1981; MACEDO et al., 1981, 1986a; CALDERON, 1988; SPADELLA, 1989; BREIM, 1990; KARASIK & HATTORI, 1994).

Uma das características do estado hiperglicêmico, a poliúria, foi também reproduzida por esse modelo experimental. Os ratos do GD sempre apresentaram diurese maior que os do GC, tanto no M1 quanto no M2. A concentração elevada da glicose no filtrado glomerular excede a capacidade das células tubulares de reabsorvê-la, provocando diurese osmótica, com grande volume urinário, de elevada osmolaridade (FELIG & BERGMAN, 1995; SHERWIN, 2000). A hiperosmolaridade resultante dos altos níveis de glicose circulante promove a passagem da água do meio intracelular para o extracelular para manter o equilíbrio osmótico. A desidratação intracelular é percebida pelos osmorreceptores cerebrais, desencadeando sede intensa (COTRAN et al., 1989).

Neste trabalho os animais do GD tiveram ingestão hídrica superior à observada nos do GC. Desta forma, este experimento reproduziu tanto a poliúria quanto a polidipsia, sinais frequentemente presentes no diabetes (COHEN et al., 1972; BABEL & LEUENBERGER, 1974; HORI et al., 1980; JONASSON et al., 1985).

Também foram importantes para a caracterização do estado diabético, o estudo dos parâmetros bioquímicos: glicemia e glicosúria, tendo havido diferença significativa entre GC e GD, tanto no M1 quanto no M2.

Os animais do GC mantiveram níveis de glicemia de jejum compatíveis à espécie durante a pesquisa, não tendo apresentado glicosúria. Os animais do GD

apresentaram níveis altos de glicemia e glicosúria, decorrentes do diabetes grave induzido pela Aloxana (ORLOFF et al., 1975; UEDA et al., 1979; REDDI, 1985; BLAIR et al., 1984; MACEDO et al., 1986 a, 1986 b; VINOES et al., 1988).

Neste modelo experimental foram reproduzidas a perda de peso, a polidipsia, a poliúria, assim como a glicosúria, presentes no M1 e no M2. Estas alterações fazem parte da doença diabética (SHERWIN, 2000) e definem que os animais do GD apresentaram a doença durante todo o período de seguimento.

Apesar do rato não desenvolver nos olhos exatamente a doença diabética como ela ocorre nos humanos (TILTON et al., 1986; SCHELLINI, 1992), ainda assim este é um bom modelo experimental. As vantagens de sua utilização no estudo do diabetes experimental estão por conta do fácil manuseio, possibilidade de se trabalhar com vários animais ao mesmo tempo uma vez que as gaiolas não ocupam grandes espaços, baixo preço para aquisição dos animais, resistência a infecções e pouca exigência quanto à dieta.

Outros animais que são utilizados para pesquisas que envolvem o diabetes são o cão (PATZ & MAUMENEE, 1962) e o macaco (GIBBS et al., 1969). Ambos possuem ciclo de vida muito mais longo e devem ser seguidos por tempo muito superior, caso se deseje observar as alterações crônicas da moléstia.

Os ratos possuem ciclo de vida curto, o que possibilita a visualização de alterações crônicas após cerca de um ano de observação, tendo sido estabelecido o tempo de seguimento de um ano baseado nas observações de estudo prévio, quando Schellini (1992) avaliou ratos diabéticos de 1, 3, 6, 9 e 12 meses e verificou que as alterações mais importantes estavam presentes nos animais de 12 meses de doença. A partir daí, ficou estabelecido que este seria o tempo ideal para pesquisa das alterações crônicas da doença,

ou seja, este intervalo é o suficiente para a instalação dos fenômenos degenerativos da senilidade e das alterações crônicas decorrentes da descompensação metabólica.

Portanto, para a realização de estudos experimentais utilizando modelos animais, há necessidade de se ter uma metodologia criteriosa e muito bem definida. Qualquer que seja o modelo experimental, dificilmente reproduz de forma total as alterações observadas no homem. Porém, com eles é possível se conduzir as variáveis de estudo, possibilitando observar a patogenia e a evolução do processo, assim como o efeito de drogas usadas para o tratamento.

5.2. QUANTO AOS PARÂMETROS MORFOLÓGICOS

A motivação para o estudo dos vasos da íris foi a de constatar se existem alterações na vasculatura iriana, fato já bem estabelecido para a retina.

Clinicamente já foram descritas lesões irianas em indivíduos diabéticos, havendo a denominação de iridopatia diabética simples e proliferativa, correspondentes similares da retinopatia simples e proliferativa, respectivamente (DEMELER, 1978; 1979).

Quando presentes, os neovasos irianos são permeáveis à fluoresceína, sendo possível identificar vazamentos de contraste em exames angiofluoresceinográficos em portadores de diabete de longa evolução (DEMELER, 1978).

Existem relatos que realçam a importância do estudo da íris diabética, uma vez que já foi comprovada a correlação entre retinopatia e iridopatia diabética, sendo sugerido em olhos que possuem os meios opacos, a realização de angiografia fluorescente da íris para se inferir sobre a presença da retinopatia (BRANCATO et al., 1994).

Avaliando clinicamente olhos de 56 ratos diabéticos por estreptozotocina, observou-se presença de engurgitamento de vasos irianos e hifema em 8,9% dos animais logo após a indução da doença (SALLMANN & GRIMES, 1971). Este fato também foi relatado em ratos portadores de diabetes aloxânico (JANES et al., 1957), mas não foi observado em nenhum dos nossos animais.

O exame ao microscópio de luz não permitiu identificar diferenças entre os grupos de estudo, uma vez que as alterações ocorrem no nível sub-microscópico. Também ao exame clínico, usando a lâmpada-de-fenda, pode-se não conseguir avaliar a presença de lesões que seriam identificadas apenas com exame angiofluoresceinográfico (DEMELER, 1979).

Ao microscópio eletrônico, entretanto, foi possível estabelecer a presença de lesões irianas, identificando-se diferenças entre a íris de ratos normais e diabéticos. Apenas Kojima et al.(1972) haviam feito estudo semelhante ao presente, experimental e de caráter prospectivo, avaliando a ultra-estrutura dos vasos da íris e corpo ciliar de ratos diabéticos aloxânicos de 6 meses de idade, tendo sido os achados bastante semelhantes aos aqui descritos.

Observou-se que a íris possui vasos não fenestrados, semelhantes aos que existem na retina (SCHELLINI, 1992) e ao contrário do que ocorre na coróide (RODRIGUES, 2000) e no corpo ciliar (BOSSO, 2002), onde os vasos não possuem uniões selantes entre as células endoteliais.

Diferentemente dos vasos retinianos, coroidais ou do corpo ciliar (SCHELLINI, 1992; RODRIGUES, 2000; BOSSO, 2002), os vasos da íris possuem muitas saliências e reentrâncias em suas paredes. O motivo deve estar relacionado à grande necessidade de mobilidade que existe na íris (HOGAN et al., 1971), sujeita à dilatação e

contração, em decorrência de fenômenos luminosos, emocionais, efeito de drogas sistêmicas ou tópicas, além de resposta a estímulos variados.

As células endoteliais da íris de ratos possuem características semelhantes às células endoteliais de outras localizações do olho (SCHELLINI, 1992; RODRIGUES, 2000; BOSSO, 2002), com relação ao seu conteúdo citoplasmático.

As projeções citoplasmáticas semelhantes a dedos-de-luva (projeções filopoidais) em direção à luz vascular já foram comentadas por Kojima et al.(1972) que observaram a formação de protusões em forma de “bolhas” em direção à luz vascular e que denominamos de formações em arco. Estas imagens poderiam ser formadas pela união de pregas digitiformes unidas por seus ápices e não possuem significado patológico, podendo corresponder à macropinocitose, fato que pode ser deduzido pela observação detalhada de imagens sequenciais, assim como pela presença de muitos vacúolos de conteúdo eletrónico-lucente no citoplasma das células, principalmente na face voltada para a luz vascular. Aspecto semelhante também ocorre nos vasos do corpo ciliar (KOJIMA et al., 1972; BOSSO, 2002).

Comparando-se os animais do GCM1 com os do GCM2, foi possível observar que estes últimos apresentaram aumento das vesículas intra-citoplasmáticas em células endoteliais. Estas vesículas estão relacionadas ao transporte transcitoplasmático de substâncias e, estando presentes em abundância, mostram que nesta região tal meio de transporte é bastante utilizado. O aumento do número de vesículas em animais mais velhos (GCM2) poderia ser imputado à involução senil.

Quando os animais são diabéticos, comparando-se com animais normais (GDM1 com GCM1) , já foi possível observar o aumento das vesículas intracitoplasmáticas, o que se acentuou nos animais do GDM2, demonstrando que as alterações ocorrem na

vasculatura iriana, tanto pelo envelhecimento quanto pela presença do diabetes, e que são progressivas.

O aumento das vesículas nas células endoteliais de ratos diabéticos aloxânicos já havia sido observado na íris e no corpo ciliar, com destaque para maior ocorrência em arteríolas do que em capilares e vênulas (KOJIMA et al., 1972), exatamente como o que foi observado neste estudo.

Outra alteração observada principalmente nos animais do GD, foi o aumento de estruturas elétron-densas, traduzindo provavelmente o aumento de lisossomos, corpos densos e “figuras de mielina”, além de vacúolos opticamente vazios, demonstrando que deve estar ocorrendo morte de organelas celulares que estão sendo removidas do citoplasma nestes animais.

O aumento dos corpos densos já havia sido relatado por outros que, além deles, também identificaram edema de células endoteliais em vasos irianos de ratos diabéticos (BABEL & LEUENBERGER, 1976). Porém, a caracterização do edema celular é difícil de ser feito ao microscópio de transmissão, uma vez que existem células de diferentes tamanhos, de acordo com o diâmetro e tipo dos vasos, devendo-se empregar outros métodos de pesquisa que não o exame ultra-estrutural para melhor evidenciá-lo.

Alterações celulares semelhantes foram observadas nas células endoteliais da retina (SCHELLINI, 1992), assim como da coróide (RODRIGUES, 2000) e do corpo ciliar (BOSSO, 2002) de ratos diabéticos aloxânicos, mostrando que o diabetes afeta os olhos como um todo.

Externamente às células endoteliais, existem os pericitos, células que possuem função de suporte, auxiliares na contração da parede vascular e participantes da fagocitose (COGAN et al., 1961).

Nos ratos, os vasos retinianos (SCHELLINI, 1992), os do corpo ciliar (BOSSO, 2002), assim como os irianos são envoltos por pericitos, embora no ser humano haja descrição de apenas células musculares ao redor de células endoteliais nos vasos da íris (HOGAN et al., 1971). Tilton et al. (1986) também observaram pericitos no envoltório vascular da íris de ratos. Portanto, o rato possui pericitos e/ou células musculares envolvendo as células endoteliais da íris, provavelmente ambas possuindo a mesma função de suporte e auxiliares na contração da parede vascular.

Observou-se no presente estudo que os pericitos apresentam alterações mais acentuadas que as células endoteliais. Este fato já havia sido observado anteriormente nos vasos retinianos, quando os pericitos também estão mais alterados que as células endoteliais, chegando a ser chamados de “pericitos fantasmas” (SCHELLINI, 1992), por serem células que possuem o seu envoltório, mas apresentam destruição das organelas citoplasmáticas.

Na íris, observou-se que as células musculares também apresentaram mais alterações que as células endoteliais.

A falha ou falta da função das células musculares e dos pericitos deve propiciar fluxo lento e facilitar os fenômenos vaso-oclusivos, comuns na doença diabética. Além disso, pode propiciar o aparecimento das dilatações aneurismáticas da parede vascular, não evidenciadas no presente estudo por não se ter feito avaliação da árvore vascular, como quando se usa o método da digestão tripsínica.

Os fibroblastos perivasculares de ratos diabéticos apresentaram gotas lipídicas, assim como o aumento das vesículas e dos corpos densos, o que são provas de que o metabolismo dos fibroblastos também sofre a influência do estado diabético. O

aumento de gotas lipídicas já foi relatado ocorrendo nos músculos irianos de indivíduos diabéticos (FUJII et al., 1977).

Um dos principais achados do presente estudo foram as alterações da MB dos vasos que se mostrou espessada em ratos do GCM2, mas esteve muito mais espessa nos animais do GDM2. Este fato já foi realçado por outros que, inclusive, questionam se o diabetes predispõe ao espessamento da MB ou apenas acelera a instalação de um fenômeno que ocorreria em consequência da idade (BABEL & LEUENBERGER, 1976).

O espessamento da MB ocorreu especialmente nos vasos que possuem células musculares ao seu redor, podendo ser suposto nos vasos de menor calibre, tendo sido não homogêneo. O fato do espessamento ser não homogêneo, aliado à irregularidade de calibre e a presença de reentrâncias e saliências na parede vascular, impossibilitou a realização de medidas morfométricas para a quantificação deste fenômeno qualitativo, como feito, por exemplo, para vasos retinianos, por Schellini (1992).

É dito que o espessamento da MB dos vasos no diabetes precede outras alterações como a lesão dos pericitos (TILTON et al., 1986). Porém, o presente estudo não pode fazer tal constatação, uma vez que foram avaliados ratos com 1 mês e com 12 meses da doença, ou seja, com doença inicial e com doença crônica, e não com as fases evolutivas da patologia.

Babel & Leuenberger (1976), avaliando ratos diabéticos de 6 e 12 meses, portadores de doença diabética de diferentes intensidades, encontraram alterações do calibre dos vasos, assim como acúmulo de material PAS positivo nas paredes vasculares e espessamento progressivo da MB. As alterações do calibre vascular necessitam de estudos que envolvam preparações tripsínicas do tecido ou exames angiográficos, não sendo possível percebê-las em avaliações de microscopia eletrônica. Porém, o espessamento da

MB é muito bem evidenciado por estes últimos estudos, sendo o mais citado dentre os problemas que ocorrem no diabetes (YAMASHITA & BECHER, 1961; YANOFF, 1969; YANOFF & FINE, 1975).

YAMASHITA & BECKER(1961) quantificaram a espessura da MB nos vasos retinianos, constatando maior espessura em pacientes diabéticos com retinopatia diabética do que nos diabéticos sem retinopatia, realçando o caráter involutivo da doença e a associação entre o aumento da espessura da MB e a presença da retinopatia.

O espessamento da MB ocorre, talvez, devido ao acúmulo de detritos celulares decorrentes das alterações provocadas pelo diabetes ou pela acentuação de alteração involutiva que iria se estabelecer. Para YANOFF(1969), o espessamento da MB pode provocar obliteração vascular, levando a isquemia tecidual e a neoformação de vasos na retina.

A vacuolização da MB já havia sido também identificada por outros na retina (SCHELLINI, 1992), tendo sido relacionada com involução senil (HOGAN et al., 1971).

No presente estudo não foram observados neovasos na íris de ratos diabéticos. Este achado se faz presente quando existe "*Rubeosis iridis*" em olhos humanos (FRYCZKOWSKI et al., 1989), tendo sido evidenciado em ratos diabéticos após 3 meses de evolução da doença, usando preparações específicas para avaliação da árvore vascular (BABEL & LEUENBERGER, 1976) e que permitem muito mais facilmente que a microscopia eletrônica, a identificação dos neovasos que, apesar de não observados, poderiam estar presentes.

Clinicamente já foi observado que as alterações vasculares diabéticas na íris são importantes, podendo-se usá-las, inclusive como indício prognóstico, uma vez que a

iridografia pode indicar alterações mais precocemente que a angiografia retiniana (DEMELER, 1979). As alterações ocorridas na íris diabética são dependentes da duração, assim como do controle da doença (FUJII et al., 1977).

As observações morfológicas efetuadas neste estudo permitem afirmar que os ratos diabéticos apresentam alterações vasculares na íris, mais intensas em animais submetidos a descompensação metabólica por período mais prolongado. Alterações semelhantes foram evidenciadas na retina, na coróide e no corpo ciliar (SCHELLINI, 1992; RODRIGUES, 2000; BOSSO, 2002).

Assim, por este estudo constatou-se que as alterações vasculares decorrentes do diabetes acometem a íris, sendo as mesmas progressivas e semelhantes ao que existe em outras estruturas oculares.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- ❖ Os vasos irianos de ratos do GCM1 apresentaram diferenças ultra-estruturais quando comparados aos do GCM2;
- ❖ As alterações observadas no GCM2 foram aumento das vesículas citoplasmáticas, aumento de corpos densos e espessamento da membrana basal, ocorrendo em pericitos, células endoteliais, musculares e fibroblastos perivasculares;
- ❖ Os vasos irianos de ratos do GD apresentaram diferenças quando comparados aos dos ratos do GC;
- ❖ As alterações ultra-estruturais observadas nos animais do GD foram mais importantes que as do GCM2, ocorreram principalmente nos pericitos, nas células musculares, presentes também nas células endoteliais e fibroblastos perivasculares , principalmente nos ratos do GDM2;

Portanto, existem alterações nos vasos da íris de ratos decorrentes da senilidade. Alterações semelhantes ocorrem nos ratos diabéticos que as apresentam com maior intensidade, principalmente quando a descompensação metabólica ocorre por tempo prolongado.

7. ABSTRACT

The **objective** of this study was to assess the presence of morphological changes in iris vessels of both normal and diabetic alloxanic rats.

Material and Method: 16 Wistar rats have been used, divided into 2 experimental groups: Control Group (GC) and Diabetic Group (GD). The diabetes induction was made by Alloxan intravenous injection. The animals had been observed by clinical assessments and laboratory tests throughout the experimental period, having been slaughtered at 2 experimental moments:

M1 – the animals were slaughtered one month after the experiment beginning, and

M2 – the animals were slaughtered 12 months after the experiment beginning.

At both moments, the iris vessels had been studied under both optical and electronical transmission microscopes.

Results: The morphological assessment of the GC animals showed that, at M2, the rats presented dense bodies increasing and basal membrane thickening in endothelial cells, pericytes and muscles cells. GD animals presented changes in endothelial cells, pericytes and muscles cells beyond basal membrane thickening. Pericytes, as well as muscles cells, had more changes than endothelial cells. All changes were more frequent at M2, being more important in GD animals.

Conclusions: The iris vessels of rats present changes relating to senility. Similar changes occur to diabetic rats, within wider intensity, mainly when metabolic disorder continues for a longer time.

Describers: experimental diabetes, rat, iris, vessels, electronical transmission microscopy.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AIELLO, L.M., CAVALLERANO, J.D. Ocular complications of diabetes mellitus. In: KAHN, C.R., WEIR, G.C. . **Joslin's diabetes mellitus**. 13.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. p.771-93.
- ALMEIDA, H.G. **Retinopatia diabética em face da pressão intra-ocular e das pressões arteriais (braquial e oftálmica)**. Belo Horizonte, 1977. 102p.Tese(Doutorado)-Universidade Federal de Minas Gerais.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Guide to diagnosis and classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. **Diabetes Care** , v.20, suppl. 1, p. s21-7 , 1997.
- 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.
- 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.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 1997. 240p.

- BANTING, F.G., BEST, C.H. The internal secretion of the pancreas. **J. Lab.Clin. Med.**, v.7, p.251-6, 1922.
- BECKER, B. Diabetes mellitus and primary open angle glaucoma. **Am.J. Ophthalmol.**, v.71, p.1-16, 1971.
- BENGTSSON, B. The prevalence of glaucoma. **Br. J. Ophthalmol.**, v.65, p. 46-9, 1981.
- BENSON, W.E. Diabetic retinopathy. In: TASMAN, W., JAEGER, E.A. **Duane's clinical ophthalmology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998. v.3, chap.30. CD-ROOM.
- BLAIR, N.P., TSO, M. O .M., DODGE, J.T. Pathologic studies of the blood-retinal barrier in the spontaneously diabetic BB rat. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.25, p.302-11, 1984.
- BOSSO, E.P. **Alterações morfológicas no estroma do corpo ciliar de ratos normais e diabéticos aloxânicos**. Botucatu, 2002. 73p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista.
- BRANCATO, R. BANDELLO, F. , LATTANZIO, R. , GALDINI, M. , FALCOMATÀ, B. Relation between iridopathy and retinopathy in diabetes. **Br. J. Ophthalmol.**, v.78 p.542-5, 1994.
- 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) - Faculdade de 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.
- CAHILL Jr., G.F. Current concepts of diabetes. In: MARBLE, A., KRALL, L.P., BRADLEY, R.F. **Joslin's Diabetes Mellitus**. Philadelphia : Lea & Fibiger, 1985. p. 1-11.

- 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.
- CAIRD, F.J., PIRIE, A., RAMSELL, T.G. **Diabetes and the eye**. Oxford : Blackwell Scientific, 1969.
- COGAN, D.G., TOUSSAINT, D., KUWABARA, T. Retinal vascular patterns. Diabetic retinopathy. **Arch. Ophthalmol.**, v.66, p.366-71, 1961.
- COHEN, A.M., MICHAELSON, I.C., YANKO, L. Retinopathy in rats with disturbed carbohydrate metabolism following a high sucrose diet - vascular changes. **Am. J. Ophthalmol.**, v.73, p.863-9, 1972.
- COTRAN, R.S., KUMAR V., ROBBINS, S.L., Diabetes Mellitus. In: _____. **Pathologic basis of disease**. 4.ed. Philadelphia: W.B Saunders, 1998. p.994-1010.
- DANTAS,A. M.-O Olho(o bulbo ocular)In:DANTAS,A . M. **Anatomia funcional do olho e seus anexos**.Rio de Janeiro: Colina, 1983. p.63-4.
- DEMELER,U. Diabetic changes in the blood vessels of the iris.A fluorescence angiographic study. **Fortschr. Med.**, v.97, p.1373-6, 1979.
- DRYDEN, R.M. -Central vein occlusions and chronic simple glaucoma. **Arch. Ophthalmol.**,v.73. p.659-63, 1965.
- DUNN, J.S., SHEEHAN, H.L., McLETCHIC, N.G.B. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. **Lancet**, v.1, p.484-7, 1943.
- ENGERMAN, R., FINKELSTEIN, D., AGUIRRE, G.,DIDDIE, K.R., FOX, R.R., FRANK, R.N., VARMA,S.D. Ocular complications. **Diabetes**, v.31, suppl.1, p. 82-8, 1982.

- FELIG, P., BERGMAN, M. The endocrine pancreas: diabetes mellitus. In: FELIG, P., BAXTER, J.D, FROHMAN, L.A. **Endocrinology and metabolism** New York: McGraw-Hill, 1995. p. 1107-250.
- FOSTER, D. W. Diabetes Mellitus. In: FAUCI, A.S, BRAUNWALD, E., ISSELBACHER, K.J., WILSON, J.D., MARTIN, J.B., KASPER, D.L., HAUSER, S.L., LONGO, D.L. **Harrison's principles of internal medicine**. 14.ed. New York: McGraw-Hill, 1998. p.2060-81.
- FRYCZKOWSKI, AW., HODES, BL., WALKER, J. Diabetic choroidal and iris vasculature scanning electron microscopy findings. **Intern. Ophthalmol.**, v.13, p.269-79, 1989.
- GARTNER, S., HENKIND, P.-Neovascularization of the iris(rubeosis iridis). **Surv. Ophthalmol.**, v.22, p.291-312, 1978.
- GIBBS, G., WILSON, R., HO, C. Experimental diabetes in the monkey. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PRIMATES, 2, 1969,New York. **Proceedings** ...New York: Kanger, 1969. v. 3, p.169-73.
- 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.
- GINSBERG, S.P. Corneal problems in systemic disease. In: TASMAN, W., JAEGER, E.A. (Eds). **Duane's clinical ophthalmology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998. v.5, chap.43. CD-ROM.
- HENKIND, P. The eye in diabetes mellitus: Signs, symptoms and their pathogenesis. In: MAUSOLT, F.A. (Ed). **The eye and systemic disease**. St. Louis: Mosby, 1975. p.195-220.

HOGAN, M.J., ALVARADO, J. A., WEDDELL, J.E. Iris and anterior chamber. In: HOGAN, M.J., ALVARADO, J.A., WEDDELL, J.E. **Histology of the human eye**. Philadelphia: Saunders, 1971. p.202-55.

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.

ISHIKAWA, S., FUJII, T., UGA, S. Ultrastructure of Iris Muscles in Diabetes mellitus. **Ophthalmologica**, v.174, p.228-39, 1977.

JONASSON, O., JONES, C.W., BAUMAN, A., JOHN, E., MANALIGOD, J., TSO, M.O. 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) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista.

KANSKI, J.J. Doenças vasculares da retina. In **Oftalmologia Clínica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Rio Med Livros:Revinter, 2000. p.343-77.

KARASIK, A., HATTORI, M. Use of animal models in the study of diabetes. In: KAHN, C.R., WEIR, G.C. (Eds). **Joslin's diabetes mellitus**. 13.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. p.317-50.

KASS, M. A., HART JR., W. M., GORDON, M., MILLER, J. P. Risk factors favoring the development of glaucomatous field loss in ocular hypertension. **Surv. Ophthalmol.**, v.25, p.155-62, 1980.

- 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-ROOM.
- KLEIN, B.E.K., KLEIN, R., MOSS, S.E. Intraocular pressure in diabetic persons. **Ophthalmology**, v.91, p.1356-60, 1984.
- KOJIMA, K., HASEGAWA, Y., HIRATA, K. Electron microscopic findings of the ocular tissues in alloxan rats. Part 2: On the iris and ciliary body (on the vessels of the iris and ciliary body). **Nippon Ganka Kiyo**, v.23, p.191-203, 1972.
- KUWABARA T., COGAN,D.G. Studies of retinal vascular patterns- normal architecture. **Arch. Ophthalmol.** , v.64, p.904-911, 1960
- LAVINSKY,J.,SOUZA,E.C.,ESTEVEZ,J.F.,BROILO,V.R.,DOMINGUES,C.G.Retinopatia Diabética.In.**Retina e Vítreo-clínica e cirurgia**.1ªed.São Paulo. Rocca 2000, p.485-99.
- 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.
- LIEB, W.A. , STARK, N. , JELINEK, M. B. , MALZI, R. Diabetes mellitus and glaucoma. **Acta Ophthalmol. Suppl.** , v.94 , p. 7-62, 1960.
- MACEDO, A.R., SKIVOLOCKI, W.P., THOMPSON, K.R. Morphometric electron - microscopy study of the whole pancreas transplantation on alloxan diabetic neuropathy. **Surg. Forum**, v.32, p.379-80, 1981.
- MACEDO, C.S., BREIM, L.C., MERCADANTE, M.C.S. Estudo comparativo entre as vias peritoneal e intraportal para o transplante de ilhotas de Langerhans preparadas sem

digestão enzimática. In: FORUM DE PESQUISA EM CIRURGIA DO COLÉGIO BRASILEIRO DE CIRURGIÕES, 2, 1986, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 1986a.

MACEDO, C.S., GREENLEAF, G.E., SYERS, H.J. 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. São Paulo**, v.41, p.55-60, 1986b.

MACEDO, C.S., RIYUZO, M.K., MERCADANTE, M.C.S. 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.

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

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-ROOM.

OLIVEIRA, J.E., MILECH, A., FRANCO, L.J. The prevalence of diabetes in Rio de Janeiro, Brazil. 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. 3rd, GRAMBORT, D.E., STORCK, L.G., KNOX, D. Long-term studies of pancreas transplantation in experimental Diabetes mellitus. **Ann. Surg.**, v.182, p198-206, 1975.

- PATZ, A . , MAUMENEE, A. E. Studies on diabetic retinopathy. 1. Retinopathy in a dog with spontaneous diabetes mellitus. **Am. J. Ophthalmol.**, v.54, p. 532, 1962.
- PILTZ-SEYMOUR, J. R. , STONE, R. A. Glaucoma associated with systemic disease. In RITCH, R. , SHIELDS, M.B. , KRUPIN, T. **The glaucomas**. 2.ed. St. Louis: Mosby, p.1157-76, 1996.
- REDDI, A.S. Collagen metabolism in the retina of normal and diabetic rats. **Exp. Eye Res.**, v.41, p.345-52, 1985.
- ROBISON JR, W.G., KADOR, P.F., KINOSHITA, J.H. Retinal capillaries: basement membrane thickening by galactosemia prevented with aldose reductase inhibitor. **Science**, v.221, p.1177-9, 1983.
- RODRIGUES, A.C. **Coroidopatia diabética**: estudo ultraestrutural da coróide de ratos normais e diabéticos aloxânicos. Botucatu, 2000. 137p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, 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.
- SHELLINI, S.A., **Retinopatia diabética experimental**: estudo estrutural, ultraestrutural e morfométrico da retina de ratos normais, diabéticos e diabéticos tratados. Botucatu, 1992, 228p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista.
- 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.

- SIMON, J.M., FRANÇOIS, J. Apud KIMURA,R. **Atlas em color de gonioscopia**. Barcelona: Editorial Jims, 1976. p.126.
- SJOLIE, A . K.Ocular complications in insulin treated diabetes mellitus. An epidemiological study. **Acta Ophthalmol.** ,v.172, suppl. , p.1-77, 1985.
- SLAMOVITS, T.L., GLASER, J.S. The pupils and accommodation. In: TASMAN, W., JAEGER, E.A. **Duane's clinical ophthalmology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998. v.2, chap.15. CD-ROOM.
- SOUZA FILHO, J.P., BONOMO, P.P. Diabetes mellitus. In: BELFORT Jr., R., BONOMO, P.P.**Oftalmologia e Clínica Médica**. São Paulo: Roca, 1983. p.127-41.
- SPADELLA, C.T. **Avaliação funcional do transplante pancreatoduodenal no rato diabético**. Botucatu, 1989. 220p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina , Universidade Estadual Paulista.
- SPIRANDELLI, P.E., SCHELLINI, S.A., GREGÓRIO, E., PADOVANI, C.R. Ultrastructural and morphometric alterations in iris nerves of diabetic rats. **Invest. Ophthalmol.**, v.40, p.s446, 1999.
- STREINER, D.L., NORMAN, R.A. **Biostatistics: the base essentials**. St. Louis: Mosky Year Book, 1994. 260p.
- TILTON, R.G., LA ROSE, L.S., KILO, C. Absence of degenerative changes in retinal and uveal capillary pericytes in diabetic rats. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 27, p. 716-21, 1986.
- UEDA, T., LEE, S., SOTRCK, G. Metabolic effect of alloxan diabetic rats before and after pancreas transplantation. **Proc. Anat. Microsurg. Soc.**, v.3, p.423-4, 1979.

- VINOES, S.C., CAMPOCHIARO, P.A., MAY, E.E. BLAYDES, S.H. 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.
- WAND,M. Neovascular glaucoma.In: Ritch,R & Shields,M.B. **The Secondary Glaucoma**. St. Louis: Mosby, 1982, p.162-93.
- WILSON, M.R. , MARTONE, J. F. Epidemiology of chronic open-Angle Glaucoma. In: RITCH R, SHIELDS MB, KRUPIN T.**The glaucomas**. 2.ed. St. Louis: Mosby, p.753-86 , 1996.
- YAMASHITA, T., BECKER, B. The basement membrane in the human diabetic eye. **Diabetes**, v.10, p.167-74, 1961.
- YANOFF, M. Ocular pathology of diabetes mellitus. **Am. J. Ophthalmol.**, v.67, p.21-38, 1969.
- YANOFF, M., FINE, B.S. **Ocular pathology**. Hagerstown: Harper & Row, 1975. p.565-85.
- YANOFF, M., FINE, B.S. Diabetes mellitus. **Patologia ocular**. São Paulo: Santos, 1991. p.187-95.
- ZEITER, J.H. , SHIN, D.H., BAEK, N.H. Visual field defects in diabetic patients with primary open-angle glaucoma. **Am. J. Ophthalmol.**,v.111, p.581-4, 1991.
- ZUCCA, I., TANDA, A ., PIRAS, V., MULAS, S., MUREDDU, E., LECIS, F ., SULIS, R., PALMAS, M.C., FOSSARELLO, M., SERRA, A . The influence of diabetes mellitus on primary open angle glaucoma perimetry. **Acta Ophthalmol. Scand.**, v.224, suppl., p.49-50, 1997.

Apêndice

APÊNDICE

Apêndice 1 - Medidas descritivas e resultado do teste estatístico do peso (gramas) segundo grupo e momento da avaliação

Grupo	Momento		Resultado do Teste estatístico de momento
	M ₁	M ₂	
GC	350,00±15,00	425,00±67,50	1,74 (P>0,05)
GD	230,00±45,00	267,50±85,00	1,60 (P>0,05)
Resultado do teste estatístico de grupo	2,32 (P<0,05)	1,73 (P>0,05)	

* (Mediana ± Semi-amplitude total)

Apêndice 2 - Medidas descritivas da diurese(ml/24hs) e resultado do teste estatístico segundo grupo e momento da avaliação.

Grupo	Momento		Resultado do Teste estatístico de momento
	M ₁	M ₂	
GC	14,00±4,00	16,00±7,50	0,29 (P>0,05)
GD	72,00±15,50	60,00±50,00	0,01 (P>0,05)
Resultado do teste estatístico de grupo	2,31 (P<0,05)	1,45 (P>0,05)	

* (Mediana ± Semi-amplitude total)

Apêndice 3 - Medidas descritivas da ingestão hídrica(ml/24hs) e resultado do teste estatístico segundo grupo e momento da avaliação.

Grupo	Momento		Resultado do Teste estatístico de momento
	M ₁	M ₂	
GC	49,00±6,00*	55,00±22,00	0,89 (P>0,05)
GD	99,50±25,50	139,00±62,50	1,15 (P>0,05)
Resultado do teste estatístico de grupo	2,31(P<0,05)	1,45 (P>0,05)	

* (Mediana ± Semi-amplitude total)

Apêndice 4 - Medidas descritivas da glicemia (mg%) e resultado do teste estatístico segundo grupo e momento da avaliação.

Grupo	Momento		Resultado do Teste estatístico de momento
	M ₁	M ₂	
GC	105,50±13,50*	138,00±35,00	1,15 (P>0,05)
GD	464,00±68,00	486,00±242,00	0,28 (P>0,05)
Resultado do teste estatístico de grupo	2,31 (P<0,05)	2,31 (P>0,05)	

* (Mediana ± Semi-amplitude total)

Apêndice 5 - Medidas descritivas da glicose urinária (mg%) e resultado do teste estatístico segundo grupo e momento da avaliação.

Grupo	Momento		Resultado do Teste estatístico de momento
	M ₁	M ₂	
GC	7,00±2,00*	17,00±4,50	2,32 (P<0,05)
GD	4214,00±917,00	4543,00±2119,05	1,60 (P>0,05)
Resultado do teste estatístico de grupo	2,32 (P<0,05)	2,31 (P>0,05)	

* (Mediana ± Semi-amplitude total)

Apêndice 6 - Apresentação dos dados referentes aos parâmetros avaliados

Apresentação das medidas efetuadas, segundo **GRUPO EXPERIMENTAL**:
Grupo Controle (GC) e Grupo Diabético (GD) e **MOMENTO DE SACRIFÍCIO**:
Momento 1 (M1) e Momento 2 (M2).

GRUPO	MOMENTO DE SACRIFÍCIO	PESO	DIURESE	INGESTÃO HÍDRICA	GLICEMIA	GLICOSE URINÁRIA
GC	M1	360	9	43	109	6
GC	M1	340	17	55	124	8
GC	M1	340	12	48	97	4
GC	M1	370	16	50	102	8
GC	M2	345	5	16	78	21
GC	M2	380	16	55	148	12
GC	M2	470	20	60	134	15
GC	M2	480	16	55	142	19
GD	M1	250	48	87	448	4.473
GD	M1	275	77	112	385	4.727
GD	M1	210	79	133	521	2.893
GD	M1	185	67	82	480	3.956
GD	M2	280	90	136	672	4.999
GD	M2	255	115	170	512	4.484
GD	M2	420	15	45	188	760
GD	M2	250	30	142	460	4.602