

**SILVANA ARTIOLI SCHELLINI**

**RETINOPATIA DIABÉTICA EXPERIMENTAL.  
ESTUDO ESTRUTURAL, ULTRAESTRUTURAL  
E MORFOMÉTRICO DA RETINA  
DE RATOS NORMAIS, DIABÉTICOS E  
DIABÉTICOS TRATADOS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Saúde Coletiva da Faculdade de  
Medicina da Universidade Estadual Paulista  
“Júlio Mesquita Filho”, para obtenção do Título de  
Doutor.**

**Orientador: Marcos Augusto de Moraes Silva**

**Botucatu  
1992**

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	
2.1 Animais utilizados.....	06
2.2 Grupos experimentais.....	06
2.2.1 Grupo controle.....	06
2.2.2 Grupo diabético.....	06
2.2.3 Grupo diabético tratado.....	06
2.3 Momentos experimentais.....	06
2.3.1 M1.....	07
2.3.2 M2.....	07
2.3.3 M3.....	07
2.3.4 M4.....	07
2.3.5 M5.....	07
2.4 Parâmetros morfológicos estudados.....	07
2.4.1 Exame histológico.....	07
2.4.2 Exame ultraestrutural.....	07
2.4.3 Exame morfométrico.....	07
2.5 Sequência dos tempos experimentais.....	07
2.6 Técnicas utilizadas.....	08
2.6.1 Indução do diabetes experimental.....	08
2.6.2 Manutenção dos animais.....	09

2.6.3	Técnicas utilizadas para coleta dos dados clínico laboratoriais	09
2.6.4	Administração dos tratamentos propostos.....	10
2.6.5	Sacrifício dos animais.....	11
2.6.6	Preparo dos olhos para exame morfológico.....	11
2.6.6.1	Exame histopatológico.....	11
2.6.6.2	Exame ultraestrutural.....	12
2.6.7	Documentação Fotográfica.....	13
2.6.8	Exame morfométrico.....	13
2.7	Análise Estatística.....	15

### **3 RESULTADOS**

1	Avaliação das camadas retinianas.....	16
1.1	Grupo controle.....	16
1.1.1	Epitélio pigmentar.....	16
1.1.2	Cones e bastonetes.....	17
1.1.3	Membrana limitante externa.....	18
1.1.4	Camada nuclear externa.....	18
1.1.5	Camada plexiforme externa.....	18
1.1.6	Camada nuclear interna.....	19
1.1.7	Camda plexuforme interna.....	20
1.1.8	Camada ganglionar.....	21
1.1.9	Camada de fibras nervosas.....	22
1.1.10	Membrana limitante interna.....	22
1.2	Grupo Diabético.....	23
1.2.1	Epitélio pigmentar.....	23
1.2.2	Cones e bastonetes.....	23
1.2.3	Membrana limitante externa.....	23

1.2.4	Camada nuclear externa.....	24
1.2.5	Camada plexiforme externa.....	24
1.2.6	Camada nuclear interna.....	24
1.2.7	Camada plexiforme interna.....	25
1.2.8	Camada ganglionar.....	25
1.2.9	Camada de fibras nervosas.....	26
1.2.10	Membrana limitante interna.....	27
1.3	Grupo Diabético Tratado.....	26
1.3.1	Epitélio pigmentar.....	26
1.3.2	Cones e bastonetes.....	27
1.3.3	Membrana limitante externa.....	27
1.3.4	Camada nuclear externa.....	27
1.3.5	Camada plexiforme externa.....	27
1.3.6	Camada nuclear interna.....	28
1.3.7	Camada plexiforme interna.....	28
1.3.8	Camada ganglionar.....	28
1.3.9	Camada de fibras nervosas.....	28
1.3.10	Membrana limitante interna.....	28
2	Vasculatura Retínica.....	29
2.1	Grupo controle.....	29
2.2	Grupo diabético.....	31
2.3	Grupo diabético tratado.....	32
3	Análise Morfométrica dos Vasos Retinianos.....	49
3.1	Área das células endoteliais de vasos da CG.....	49
3.2	Área das células endoteliais de vasos da CPE.....	50
3.3	Área dos pericitos de vasos da CG.....	51
3.4	Área dos pericitos de vasos da CPE.....	52

3.5	Área da membrana basal externa de vasos CG.....	53
3.6	Área da membrana basal externa de vasos da CPE.....	54
3.7	Área do lúmen de vasos da CG.....	55
3.8	Área do lúmen de vasos da CPE.....	56
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	
4.1	Quanto à metodologia.....	58
4.1.1	Modelo experimental utilizado.....	58
4.1.2	Administração dos tratamentos propostos.....	61
4.2	Quanto aos parâmetros morfológicos.....	62
4.2.1	Avaliação das camadas retinianas.....	62
4.2.2	Vasculatura retínica.....	72
4.2.3	Análise morfométrica dos vasos retinianos.....	83
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>RESUMO.....</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>120</b>

# ABREVIATURAS

AC = antes de Cristo

ACTH = hormônio adrenocorticotrófico

oC = graus Celsius

CB = camada de cones e bastonetes

CIA = companhia

CFN = camada de fibras nervosas

CG = camada de células ganglionares

cm = centímetros

CNE = camada nuclear externa

CNI = camada nuclear interna

CPE = camada plexiforme externa

CPI = camada plexiforme interna

CV = coeficiente de variação

DC = depois de Cristo

DMS = desvio mínimo significativo

EP = epitélio pigmentar

G = gauge

GC = grupo controle

GD = grupo diabético

gr = gramas

GT = grupo diabético tratado

HE = hematoxilina e eosina

hs = horas

Kg = quilograma

Ltda = limitada

M = molar

MB = membrana basal  
MBE = membrana basal externa  
MBI = membrana basal interna  
mg% = miligramas por cento  
ml = mililitros  
MLE = membrana limitante externa  
MLI = membrana limitante interna  
mm = milímetros  
Mo = momento zero  
M1 = momento um  
M2 = momento dois  
M3 = momento três  
M4 = momento quatro  
M5 = momento cinco  
PAS = ácido periódico de Schiff  
PR = Paraná  
RE = retículo endoplasmático  
RJ = Rio de Janeiro  
REL = retículo endoplasmático liso  
RER = retículo endoplasmático rugoso  
RS = Rio Grande do Sul  
SP = São Paulo  
Tm = transporte máximo  
U = unidades  
um = micra  
um<sup>2</sup> = micra ao quadrado.  
UNESP= Universidade Estadual Paulista

# 1 INTRODUÇÃO

O diabetes já era conhecido séculos antes de Cristo. CAHILL (1985), numa interessante revisão histórica, refere que no antigo "Papyrus de Ebers" (1500 AC) há a descrição de uma doença associada à perda de grande quantidade de urina, à qual ARETAEUS (250 AC), renomado médico grego, deu o nome de "diabetes", referindo-se a ela como "uma desagregação da carne e membros através da urina". Ainda segundo CAHILL (1985), foi SUSRUTA (5 DC) quem descreveu a "urina de mel", de onde, séculos depois, surgiu o nome "mellitus" (WILLIS, 1674).

A relação com o pâncreas só foi provada por MERING & MINKOWSKI (1889). Esses autores provocaram diabetes fatal em cães, após a remoção cirúrgica do pâncreas. Só no início deste século, porém, foi que OPIE (apud CAHILL, 1985) descobriu estar a falência endócrina do pâncreas localizada nas células beta.

Com a descoberta da insulina, por BANTING & BEST (1922), acreditava-se que as anormalidades causadas pelo diabetes estavam resolvidas. Porém, com a instituição do tratamento e o aumento da sobrevida dos diabéticos, multiplicaram-se os problemas crônicos e degenerativos decorrentes da descompensação metabólica. Tal fato afetou todo o organismo, e os olhos, em larga escala.

Apesar de afetar quase todas as estruturas oculares, são as alterações retinianas as mais temíveis. Segundo DUKE-ELDER (1967), a retinopatia diabética (RD) é uma doença que afeta jovens ou idosos, de caráter crônico e progressivo e, embora sua evolução seja previsível (cegueira, em porcentagem expressiva de casos), é inevitável, sendo seu tratamento relativamente impossível.

A incidência da RD está aumentando no mundo todo (ASHTON, 1958; CUNHA-VAZ, 1978). FRIEDENWALD (1950) observou que, em 1924, o número de casos de RD era o mesmo que em 1900. Observou ainda que, em 1950, esse número era 3 vezes maior que em 1924. GERMANO et al. (1985), em levantamento feito no Instituto Penido Burnier (SP), não encontraram a RD figurando entre as causas de cegueira em 1940; porém, em 1960, notaram incidência de cegueira por RD próxima a 4%, elevando-se para 13,2% em 1980.

No Norte da Itália o exame oftalmológico realizado em uma população de diabéticos detectou prevalência de 26,2% de RD (SEGATO et al., 1991). Na cidade de São Paulo, HIRATA et al. (1986) encontraram retinopatia diabética simples em 34,06%, e proliferativa em 9,42% dos pacientes diabéticos examinados. ULSON & ABUJAMRA (1986) chamam a atenção para o fato de que, no Brasil, os pacientes procuram tratamento quando a retinopatia já se encontra em fase avançada, o que piora o prognóstico.

A retinopatia é, também, importante indício prognóstico. Cinquenta por cento dos indivíduos com RD possuem alterações renais, e a sobrevida média de portadores de retinopatia proliferativa é de 5 anos (CAIRD et al., 1969; KOHNER & OAKLEY, 1975). A ausência de retinopatia pode ser correlacionada com o aumento da sobrevida dos diabéticos (OAKLEY et al., 1967).

A RD é uma das grandes causas de cegueira em muitos países (SORSBY, 1973; BLANKENSHIP & SKYLER, 1978), sendo predominante entre pessoas em idade produtiva (SORSBY, 1973; CULLIMAN, 1982; KOHNER & BARRY, 1984; MITCHELL & MOFFITT, 1990).

Segundo KENN (1972), o diabetes é responsável por 10% dos cegos da Grã-Bretanha, dos quais 80% por retinopatia. No Brasil, a magnitude do problema não é menor. O levantamento das causas de cegueira realizado por LAVINSKY

et al. (1986), em Serviços Universitários, estima que a retinopatia diabética é responsável por 4,58% dos cegos brasileiros.

Apesar dos avanços no conhecimento da fisiopatologia da moléstia e do aperfeiçoamento das técnicas terapêuticas, os índices de mortalidade e de morbidade decorrentes do diabetes continuam altos (NATIONAL COMMISSION ON DIABETES, 1976).

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

ASHTON (1949) confirmou as observações de BALLANTYNE & LÖWENSTEIN (1943), apontando os estudos anatomopatológicos como elucidativos da degeneração vascular diabética. FRIEDENWALD (1948, 1950) fez comparações anatomoclínicas entre as várias alterações encontradas na retina de pacientes diabéticos (microaneurismas, hemorragias, exsudatos, depósitos em paredes vasculares).

Segundo HOGAN & FEENEY (1963b), é necessário o estudo dos vasos retinianos, de homens e de animais, para se conhecer a gênese das doenças vasculares.

O conhecimento da ultraestrutura retiniana, evidenciando detalhes que estavam fora do alcance da microscopia óptica, iniciou-se com MAEDA (1959), que estudou vasos retinianos de olhos humanos normais. Na década de 60, vários trabalhos foram desenvolvidos, descrevendo a ultraestrutura da retina normal do ser humano e de animais (KUWABARA & COGAN, 1960; 1963; 1965; KISSEN & BLOODWORTH,

1961; ISHIKAWA, 1963; HOGAN & FEENEY, 1963a; b; TOUSSAINT & DUSTIN,1963).

Os estudos ultraestruturais sobre RD em animais de experimentação iniciaram-se com o cão, na década de 60 (ENGERMAN & BLOODWORTH, 1965; BLOODWORTH & MOLITOR, 1965; BLOODWORTH et al., 1969) e, depois com o rato, na década de 70 (LEUENBERGER et al., 1971; SOSULA et al., 1972b; BABEL et al, 1972; LEUENBERGER et al., 1974; BABEL & LEUENBERGER, 1974; DUHAULT et al., 1974). Também na década de 70, foram iniciadas as avaliações morfométricas.Os primeiros a quantificar as alterações dos vasos retinianos, de ratos normais e diabéticos, foram SOSULA et al. (1972a, b).

Após esses estudos pioneiros, outros surgiram, e novas técnicas de medida foram lançadas, na tentativa de diminuir os fatores de erro induzido (SOSULA,1974;PAPACHRISTODOULOU et al., 1976; PAPACHRISTODOULOU & HEATH, 1977; GRIMES & LATIES, 1980; ROSSI & HELDSTAB, 1981; FISCHER & GARTNER, 1982, 1983; ROBISON et al., 1983; CUTHBERTSON & MANDEL, 1986).

Entretanto, mesmo com as informações obtidas em todas as pesquisas já realizadas, a retinopatia diabética continua um mistério não resolvido (ASHTON, 1974), pouco se conhecendo de sua patologia e quase nada de suas causas (CUNHA-VAZ, 1978).

A utilização de animais de experimentação, os estudos histológicos e, principalmente, os ultraestruturais, têm sido de grande auxílio para a compreensão de pontos pouco conhecidos de sua fisiopatogenia. Todavia, ainda há muitos aspectos a serem melhor elucidados. Em vista disso, foi desenvolvido este trabalho, que teve por objetivos estudar:

- a estrutura e a ultraestrutura da retina de ratos normais,de diferentes idades;
- as diferenças entre a retina de ratos normais e de diabéticos, de diferentes idades;

- a retina de ratos diabéticos tratados, comparada à de ratos normais e de diabéticos não tratados, de diferentes idades.

## **2 MATERIAL E MÉTODO**

### **2.1 ANIMAIS UTILIZADOS**

Foram utilizados 60 ratos da raça Wistar, de ambos os sexos, com idade de 3 meses. Os ratos pesavam de 200 a 300 gr. cada e, ao exame clínico estavam sadios.

### **2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Os animais foram divididos por sorteio, em 3 grupos experimentais, como segue:

**2.2.1 GRUPO CONTROLE (GC)** - 20 ratos normais.

**2.2.2 GRUPO DIABÉTICO (GD)** - 20 ratos diabéticos, que não receberam qualquer tipo de tratamento.

**2.2.3 GRUPO DIABÉTICO TRATADO (GT)** - 20 ratos diabéticos, tratados com dieta contendo hipoglicemiante oral, associada à insulino-terapia.

### **2.3 MOMENTOS EXPERIMENTAIS**

Foi considerado, como momento zero ( $M_0$ ), o dia do sorteio dos ratos para os respectivos grupos experimentais, que foi coincidente com o dia da indução

do diabetes, no GD e no GT. Os demais momentos corresponderam aos dias de sacrifício dos animais, e ocorreram como segue:

**2.3.1 M<sub>1</sub>** - 1 1/2 mês após M<sub>0</sub>

**2.3.2 M<sub>2</sub>** - 3 1/2 meses após M<sub>0</sub>

**2.3.3 M<sub>3</sub>** - 6 1/2 meses após M<sub>0</sub>

**2.3.4 M<sub>4</sub>** - 9 1/2 meses após M<sub>0</sub>

**2.3.5 M<sub>5</sub>** - 12 1/2 meses após M<sub>0</sub> .

Foram sacrificados, a partir de M<sub>1</sub>, quatro animais de cada grupo, em cada momento experimental.

## **2.4 PARÂMETROS MORFOLÓGICOS ESTUDADOS**

**2.4.1 Exame Histológico:** foram avaliadas as camadas e a vasculatura retinianas dos ratos do GC, do GD e do GT.

**2.4.2. Exame ultraestrutural:** foram avaliadas as células de cada uma das camadas retinianas, e a composição tecidual dos vasos dos ratos do GC, do GD e do GT.

**2.4.3. Exame morfométrico:** foi realizado para estudo dos vasos da camada ganglionar e da camada plexiforme externa. Foram medidas as áreas das células endoteliais, dos pericitos, da membrana basal e da luz capilar, dos ratos do GC, do GD e do GT.

## **2.5 SEQÜÊNCIA DOS TEMPOS EXPERIMENTAIS**

- 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 (conforme item 2.6.3) quinzenal a partir do dia da indução aloxânica;
- Observação diária do aspecto geral, da diurese, da ingestão hídrica, da glicosúria e da cetonúria;
- Sacrifício dos animais previamente anestesiados, de acordo com os momentos experimentais;
- Imediata enucleação dos olhos;
- Processamento, de um dos olhos, para exame histopatológico e, do outro, para exame ultraestrutural.

## **2.6 TÉCNICAS UTILIZADAS**

### **2.6.1 INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL**

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

Os animais foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas, recebendo água "ad libitum". A seguir, para facilitar-se a visualização das veias caudais, cada animal foi colocado em caixa aquecida por lâmpada elétrica, por cerca de 10 minutos. Daí, os ratos foram transferidos para uma pequena caixa de contenção, que permitia 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 da 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.

### **2.6.2 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS**

Os animais foram mantidos em caixas individuais no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, sob condições iguais de temperatura e iluminação.

Os ratos do GC e do GD receberam ração Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes e Produtos Veterinários LTDA - PR). Os do GT receberam hipoglicemiante oral (acarbose) adicionado à dieta habitualmente fornecida aos animais, e injeções de insulina. Todos os animais receberam água "ad libitum".

### **2.6.3 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA COLETA DOS DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS**

Para acompanhamento dos animais, procedeu-se a avaliações clínico-laboratoriais, realizadas quinzenalmente após a indução do diabetes, da seguinte forma:

- Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, durante 24 horas;
- Foi fornecido volume conhecido de água, durante 24 horas;
- Foi fornecida quantidade conhecida de ração Nuvilab - CR1 (GC e GD) e de ração contendo acarbose (GT), durante o período noturno de 12 horas,

- após o que, os animais entravam em jejum de 12 horas;
- No final do período de jejum, os animais foram pesados e foi avaliado o volume, tanto de água ingerida (ml/24 hs); como o de diurese (ml/24 hs);
  - Foram coletadas amostras de 10 ml da urina de 24 horas para dosagem de glicose urinária (mg %), seguida da realização de glicosúria e cetonúria;
  - 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.

#### **2.6.4 ADMINISTRAÇÃO DOS TRATAMENTOS PROPOSTOS**

**Acarbose** (Bay G-5421-CIA Bayer do Brasil) - o hipoglicemiante oral foi misturado à ração Nuvilab CR1, na proporção de 50 miligramas por 100 gramas da ração, e oferecido diariamente como parte do alimento a ser ingerido.

**Insulina** - foi utilizada a insulina Monotard R, insulina porcina monocomponente de ação prolongada (40.000 U/ml - Laboratório Nova Indústria LTDA), injetada por via subcutânea, na região inguinal, utilizando-se agulha calibre 13 x 4 (27G x 33/64). A dose inicial de insulina foi de 10 U por quilograma de peso corpóreo. As doses subsequentes basearam-se principalmente na glicosúria e cetonúria que foram realizadas diariamente (às 8 e às 17 hs), observando-se também o estado clínico geral do animal, a diurese, a ingestão hídrica e as dosagens de glicemia e de glicose urinária (exames realizados quinzenalmente). Por exemplo: tendo-se obtido glicosúria negativa às 17 horas, foi suspensa a dose de insulina; com glicosúria positiva (+++) às 8 e às 17 horas, a dose de insulina foi aumentada em 2 ou 3 U/kg de peso; e com glicosúria negativa às 8 horas e positiva (+++) às 17 horas, foi mantida a dose prescrita no dia anterior.

## **2.6.5 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 que perdessem os reflexos.

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

## **2.6.6 PREPARO DOS OLHOS PARA EXAME MORFOLÓGICO**

### **2.6.6.1 Exame histopatológico**

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

- Secção escleral de cerca de 5 mm a nível do equador, usando-se bisturi com lâmina 15;
- Fixação em solução de Bouim alcoólico (Duboscq-Brasil) por 48 horas;
- Lavagem em série crescente de 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 horas) e benzol (45 minutos);
- Embebição em parafina histológica, em ponto de fusão de 58o C;
- Inclusão em bloco de parafina;

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

### **2.6.6.2 Exame ultraestrutural**

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

- Fixação em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3;
- Secção sagital do globo a nível do equador, usando-se lâmina de barbear;
- Dissecção do globo ocular, com auxílio de pinças, sob lupa (Karl Zeiss) com aumento de 2,0 vezes;
- Separação da retina e coróide da esclera, com auxílio de 2 pinças delicadas;
- Recorte da retina temporal, no polo posterior, em fragmentos de 3x1 mm, com lâmina de barbear, sobre cera de dentista rosa, em gota da solução fixadora;
- Coleta dos fragmentos, por meio de pipetas, sendo os mesmos recolocados em glutaraldeído 2,5% por um período de 3 horas;
- Pós-fixação em ácido ósmico 1%, em tampão fosfato 0,1 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 37o C, sendo preparados 6 blocos de cada animal;
- Colocação em estufa a 60o 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%;

### **2.6.7 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA**

Foram obtidas, ao microscópio eletrônico de transmissão, micrografias das camadas retinianas, com aumento final de 7.500 vezes. Para os vasos retínicos, o aumento final foi de 21.000 vezes. Algumas fotografias foram feitas com aumentos maiores (até 50.000 vezes) para documentação de detalhes ultraestruturais.

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

### **2.6.8 EXAME MORFOMÉTRICO**

O exame morfométrico foi feito em 4 animais de cada grupo, em cada um dos momentos experimentais. Em cada animal foram selecionados 5 vasos da camada ganglionar e 5 da camada plexiforme externa, excluindo os vasos que fossem formados por mais de 3 células endoteliais e os cortados tangencialmente.

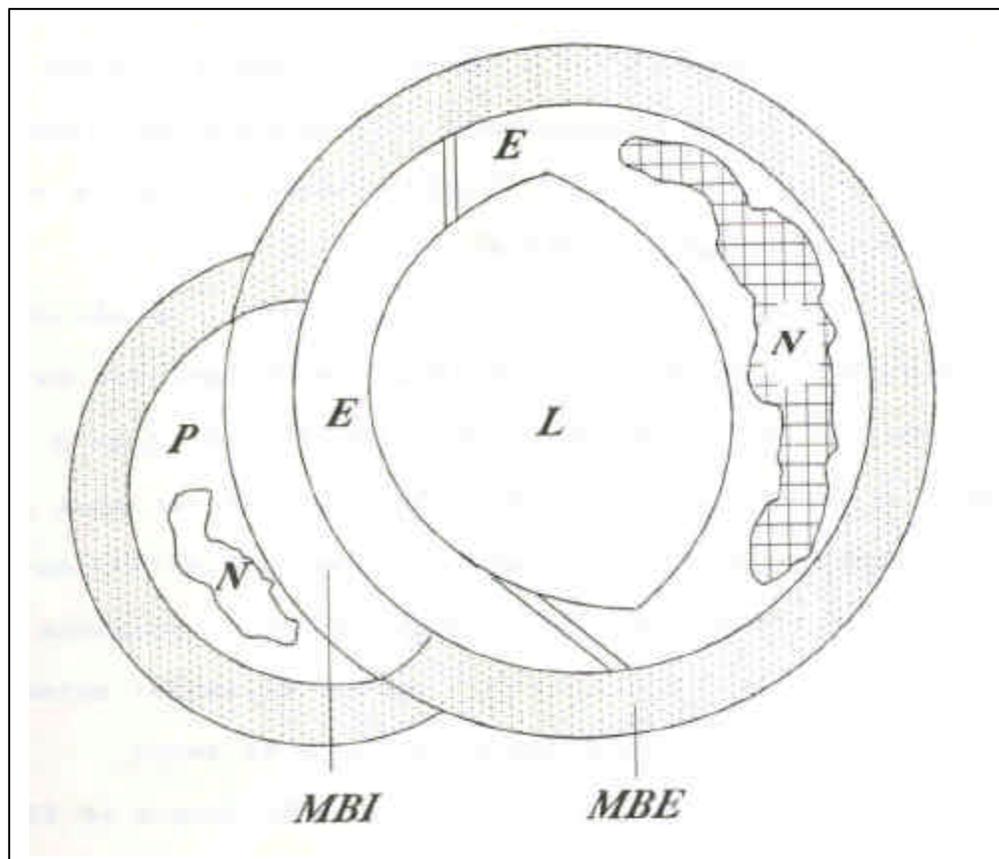
O exame foi feito com aparelho computadorizado (Mini-Mop-Kontron Bildanalyse - Kontron Eletronic Group) com cursor circular sobre prancha digitadora, medindo-se as micrografias eletrônicas com aumento padronizado em 21.000 vezes.

Foram feitas medidas de área das células endoteliais, dos pericitos, da membrana basal (MB) e da luz capilar (Figura 1).

Nas medidas de área das células endoteliais e pericíticas, a área referente ao núcleo celular foi excluída.

A medida da área da MB foi feita na membrana basal externa (MBE), incluindo a medida da MB da célula adjacente.

Todas as medidas foram feitas (pela autora) sem conhecimento do grupo a que pertenciam os animais.



**FIGURA 1:-** Capilar retiniano - Endotélio (E). Pericito (P). Núcleo (N). Lúmen (L). Membrana basal externa (MBE). Membrana basal interna (MBI)

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados referentes aos parâmetros clínicos, bioquímicos e variáveis morfométricas foi realizada por meio de análises descritivas (valor máximo, valor mínimo, média, desvio-padrão e coeficiente de variação) para os 3 grupos, nos 5 momentos de sacrifício. Para a comparação da média dos valores

dessas variáveis, foi empregada a técnica da análise de variância para o esquema fatorial 3 x 5 (grupos: 3 níveis; momentos: 5 níveis) em experimentos inteiramente casualizados, e complementada com o teste de Tukey (OSTLE, 1973).

Para a leitura, nas tabelas das médias dos valores, deve-se considerar o seguinte esquema:

- foram utilizadas letras minúsculas para a comparação entre os grupos, dentro de cada um dos momentos. A significância foi dada quando duas médias não tiveram letras em comum;
- foram utilizadas letras maiúsculas para a comparação entre os momentos. A significância foi dada quando duas médias não tiveram letras em comum.

Todas as conclusões estatísticas foram realizadas ao nível de 5% de significância.

### **3 RESULTADOS**

## **1. AVALIAÇÃO DAS CAMADAS RETINIANAS**

### **1.1. Grupo Controle (GC)**

A avaliação das camadas retinianas mostrou que a retina dos ratos possui a mesma estrutura que a dos humanos, sendo formada por 10 camadas que descreveremos à seguir:

#### **1.1.1. Epitélio Pigmentar (EP)**

É constituído por uma camada uniestratificada de células contendo quantidade abundante de pigmento melânico (Figura 2b).

À microscopia eletrônica, há uma membrana basal retilínea que não acompanha as inúmeras invaginações existentes na membrana plasmática (Figura 3a,b). Lateralmente, próximo ao ápice celular, há junção selante, seguida por junções aderentes. Na face apical há extensos prolongamentos citoplasmáticos que se dirigem para os fotorreceptores, envolvendo e, às vezes, englobando os segmentos externos dos cones e dos bastonetes (Figura 3c,d).

O núcleo ocupa posição mediana, é geralmente ovóide, de tamanho variável, com cromatina mais densa próximo à carioteca, sendo que alguns apresentam nucléolo evidente.

No citoplasma, foram observadas mitocôndrias ovóides, concentradas, principalmente próximo às invaginações basais e faces laterais da célula. Retículo endoplasmático liso (REL), bastante exuberante, e ocupando grande parte do citoplasma. Aparelho de Golgi em posição supra-nuclear, geralmente voltado para a superfície apical da célula. Na posição médio-apical, foram observados grânulos

pigmentares de tamanho e forma irregulares, alguns de conteúdo denso, homogêneo e outros rarefeitos; corpos densos, lisossomos e gotículas lipídicas, mais frequentes e maiores em animais do M<sub>5</sub> (Figura 3a).

### **1.1.2 Cones e Bastonetes (CB)**

À microscopia óptica, observou-se que os segmentos externo e interno dos bastonetes são mais estreitos e mais longos que os dos cones. O segmento interno é mais homogêneo que o externo e possui glicogênio, que foi encontrado mais frequentemente no M<sub>4</sub> e no M<sub>5</sub> (Figura 2d).

À ultraestrutura, verificou-se que os segmentos externos de CB não possuem uniões com o EP, estando justapostos aos ápices de células pigmentadas e rodeados pelas projeções citoplasmáticas do EP (Figura 3d, 4d).

Os segmentos externos de CB são formados por "discos empilhados", envoltos por membrana plasmática. O número de discos, bem como a distância entre eles, é maior nos bastonetes, fazendo com que o segmento externo dos bastonetes seja mais longo que o dos cones.

Os segmentos externo e interno estão ligados por meio de cílio conectante (Figura 5a). A porção proximal do segmento externo é envolvida por expansões citoplasmáticas do segmento interno.

A porção distal do segmento interno possui maior concentração de mitocôndrias, que são alongadas, paralelas ao maior eixo da célula e dispostas junto à membrana plasmática. A porção proximal, envolta por microvilos de células de Müller, é rica em ribossomos, microtúbulos e retículo endoplasmático rugoso (RER). Nos segmentos externo e interno foram observados grânulos de glicogênio no citosol, acumulados, às vezes, sob forma "cística" e envoltos por halo transparente e pseudomembrana, mais numerosos em animais do M<sub>4</sub> e do M<sub>5</sub> (Figura 5b, c, d).

### **1.1.3 Membrana limitante externa (MLE)**

À microscopia óptica, observou-se que há uma fina região eosinofílica após a camada de CB, correspondente à MLE (Figura 2a).

O exame ultraestrutural mostrou que essa "membrana" é a imagem resultante de uniões aderentes entre fotorreceptores e/ou células de Müller (Figura 5b,d).

Não foram constatadas alterações na MLE, nos diferentes momentos experimentais.

### **1.1.4 Camada Nuclear Externa (CNE)**

Notou-se, à microscopia óptica, que os núcleos de cones e bastonetes estão dispostos em várias "pseudocamadas", e que os cones possuem núcleos maiores que os bastonetes (Figura 2a).

Ao exame ultraestrutural, esses núcleos apresentaram-se ovóides, com cromatina bastante condensada na região central e rodeados por estreita faixa de citoplasma com escassas organelas. Os prolongamentos citoplasmáticos dos fotorreceptores e seus axônios são ricos em microtúbulos, e os de células de Müller são reconhecidos por sua maior eletrondensidade. Algumas vezes ocorreram espaços claros entre os núcleos e os prolongamentos citoplasmáticos (Figura 7a).

### **1.1.5 Camada Plexiforme Externa (CPE)**

A CPE foi vista, ao microscópio óptico, como uma faixa eosinofílica rendilhada (Figura 2a).

Foram observados, à microscopia eletrônica, os axônios de bastonetes e suas terminações sinápticas, as quais apresentam formato arredondado. As terminações foram identificadas pela presença de lamelas sinápticas dispostas perpendicularmente à sinápsis, próximas a arcos eletrondensos. Os axônios de cones

possuem terminações sinápticas eletrondensas, de formato piramidal e contêm lamelas sinápticas paralelas às sinápses (Figura 8a). As terminações sinápticas de cones são maiores que as de bastonetes, existindo em ambas algumas mitocôndrias, microtúbulos e inúmeras vesículas sinápticas (Figura 8b). Há terminações de cones justapostas às de bastonetes e aos prolongamentos citoplasmáticos de células horizontais, bipolares e de Müller. Esses prolongamentos citoplasmáticos possuem formatos irregulares (ovalados, trapezoidais) e são ricos em vesículas sinápticas.

Foi notado, em alguns prolongamentos citoplasmáticos de animais mais idosos (M<sub>4</sub>, M<sub>5</sub>), aumento de debris celulares, na forma de vacúolos digestivos e corpos residuais com "figuras de Mielina".

#### **1.1.6 Camada Nuclear Interna (CNI)**

À microscopia óptica, foi verificado que os núcleos de células horizontais ficam mais próximos à CPE. São grandes, ovóides e com maior eixo paralelo às camadas retinianas. Os núcleos bipolares são menores, estando dispostos em 2 ou mais camadas. Os núcleos de células amácrinas estão mais próximos à camada plexiforme interna (CPI), são os mais volumosos e possuem cromatina frouxa e nucléolo evidente. Os núcleos das células de Müller diferenciam-se dos demais pelo formato hexagonal e maior densidade, estando geralmente dispostos em duas camadas (Figura 2a).

Ao exame ultraestrutural foi constatado que as células horizontais possuem núcleo com cromatina grumosa, mais densa junto à carioteca. O citoplasma contém mitocôndrias, ribossomos, REL e RER, aparelho de Golgi e raros lisossomos e corpos densos. Os prolongamentos citoplasmáticos são paralelos às camadas retinianas e dirigidos para a CPE (Figura 9a).

Foram encontradas células bipolares de diferentes tamanhos, contendo núcleo redondo ou oval e as mesmas organelas citoplasmáticas das células horizontais. As células bipolares emitem prolongamentos citoplasmáticos em direção à

CPE, e axônios em direção à CPI. Os axônios diferenciam-se dos prolongamentos citoplasmáticos por possuírem maior quantidade de microfilamentos (Figura 9c,d).

As células amácrinas foram facilmente identificadas. Além de sua localização preferencial próxima à CPI, têm formato piriforme, núcleo com cromatina frouxa, nucléolo evidente e indentação característica. Possuem prolongamento citoplasmático voltado para a CPI e o citoplasma contém as mesmas organelas observadas em células horizontais, destacando-se pela riqueza de ribossomos, polirribossomos e retículo endoplasmático (RE) (Figura 9a, b, c).

Foi observado que as células de Müller possuem núcleos de diferentes tamanhos, formato angulado, cromatina bastante eletrondensa, porém não grumosa, e localizam-se, geralmente, no terço interno da CNI. Há pequena faixa citoplasmática ao redor dos núcleos, onde foram encontrados muitos grânulos de glicogênio, REL exuberante e as mesmas organelas das demais células da CNI. Emitem longos prolongamentos citoplasmáticos, que vão desde a MLE até a membrana limitante interna, dispostos perpendicularmente à superfície retiniana (Figura 9a, c).

No citoplasma de todos os tipos celulares dessa camada, foi verificada pequena quantidade de corpos densos, lisossomos e debris celulares, principalmente em animais do M<sub>4</sub> e do M<sub>5</sub>.

### **1.1.7 Camada Plexiforme Interna (CPI)**

Ao microscópio óptico, a CPI mostrou-se semelhante à CPE, diferindo desta por sua maior espessura (Figura 2a).

Nos cortes ultraestruturais, foi verificado que os axônios e prolongamentos citoplasmáticos são circulares ou ovóides. Eles contêm microtúbulos, vesículas sinápticas, poucos ribossomos, RE e mitocôndrias. Os prolongamentos amácrinos e ganglionares possuem maior diâmetro que os axônios bipolares. Estes últimos contêm maior quantidade de microtúbulos, podendo apresentar raros corpos

densos. Prolongamentos citoplasmáticos de células de Müller e microgliais permeiam os demais. Entre algumas membranas sinápticas há zonas de maior eletrondensidade. Os axônios e prolongamentos formam um "emaranhado", tendendo a assumir posição paralela ao plano retiniano (Figura 11c,d).

### **1.1.8 Camada Ganglionar (CG)**

As células ganglionares são identificadas, ao microscópio óptico, por seu núcleo grande, contendo cromatina frouxa. As células microgliais, e da glia perivascular, possuem núcleo denso e anguloso (Figura 2a,c).

O estudo ultraestrutural mostrou células ganglionares de diferentes tamanhos, geralmente redondas ou ovóides, núcleo arredondado excêntrico. A cromatina é bastante frouxa e condensada próxima à carioteca, às vezes com nucléolo evidente. No citoplasma, observou-se presença de corpos densos, irregulares no formato e densidade, exuberância de polirribossomos, RER, Golgi, mitocôndrias ovóides e microtúbulos (Figura 13 a,b). As células ganglionares emitem prolongamentos citoplasmáticos em direção à CPI e axônios, ricos em microfilamentos, em direção à superfície interna da retina.

As células da glia retiniana, exceto as células de Müller, possuem seus núcleos nessa camada. Algumas estão localizadas próximas a vasos (glia perivascular), outras, próximas a células ganglionares ou entre neurônios (células microgliais). Dentre as células da glia perivascular, algumas são eletrondensas, com núcleo de cromatina descondensada e nucléolo evidente, citoplasma com RER exuberante e dilatado, mitocôndrias e aparelho de Golgi bem desenvolvido. As células microgliais são mais claras, hexagonais, com núcleo e conteúdo citoplasmático semelhantes aos de células ganglionares.

Os longos prolongamentos citoplasmáticos de células de Müller permeiam as demais estruturas.

Observou-se aumento de glicogênio e de corpos densos em todos os tipos celulares da CG em animais do M<sub>4</sub> e do M<sub>5</sub>.

### **1.1.9 Camada de Fibras Nervosas (CFN)**

À microscopia óptica, a CFN apresentou-se com aspecto fibrilar eosinofílico, principalmente na região próxima ao nervo óptico (Figura 2a).

O exame ultraestrutural mostrou axônios de células ganglionares, de formato arredondado, ricos em microtúbulos e com poucas mitocôndrias. Os axônios se reúnem em feixes, paralelos ao plano retínico, em direção ao nervo óptico. Quanto mais próximos ao nervo óptico mais espessos tornam-se os feixes. Prolongamentos citoplasmáticos de células de Müller também participam desta camada.

### **1.1.10 Membrana Limitante Interna (MLI)**

Foi vista, em HE, como uma tênue membrana que delimita o final da retina e o início da cavidade vítrea (Figura 2a).

Ao exame ultraestrutural, a MLI é visualizada como uma membrana fibrilar osmiofílica, formada pela MB de células de Müller e de outras células gliais, acrescida de fibrilas do vítreo (Figura 13d).

## **1.2. GRUPO DIABÉTICO**

### **1.2.1. Epitélio Pigmentar (EP).**

Os ratos do GD apresentaram invaginações basais pouco pronunciadas e em menor quantidade que os do GC. Apresentaram também núcleo às vezes rarefeito e, no citoplasma, aumento na quantidade e no tamanho de corpos densos,

lisossomos e gotas lipídicas que, nesses animais, distribuíram-se por todo o citoplasma. Essas alterações foram mais freqüentes nos animais do M<sub>4</sub> e do M<sub>5</sub> (Figura 4 a,b,c,d).

### **1.2.2. Cones e Bastonetes (CB).**

Os segmentos externo e interno de CB do GD apresentaram-se mais espaçados entre si. No segmento interno de CB, foi constatado aumento de corpos densos e de lisossomos, mitocôndrias edemaciadas e vacúolos intracitoplasmáticos. As mitocôndrias, muito heterogêneas quanto ao tamanho e à densidade, apresentaram diminuição no número de cristas. Foram observados vacúolos, de vários tamanhos, geralmente apresentando conteúdo eletrtransparente e "figuras de Mielina". Os "cistos de glicogênio" foram mais numerosos no GD (Figuras 2e; 6a, b, c).

Todas as alterações foram encontradas em todos os momentos, sendo mais freqüentes nos animais do M<sub>4</sub> e do M<sub>5</sub>.

### **1.2.3. Membrana Limitante Externa (MLE)**

Os animais do GD não mostraram diferenças quanto ao aspecto estrutural e ultraestrutural da MLE, quando comparados aos do GC, em todos os momentos de sacrifício.

### **1.2.4. Camada Nuclear externa (CNE)**

A cromatina nuclear de CB apresentou-se descondensada, com perda da distribuição central característica e contendo agregado eletron denso, de formato arredondado, próximo à carioteca. Animais do M<sub>5</sub> apresentaram alguns núcleos picnóticos.

Observou-se ainda, uma faixa maior e pouco densa de citoplasma ao redor do núcleo, contendo corpos densos, lisossomos e "cistos glicogênicos" (Figura 7b,

c). Os espaços claros entre os núcleos e prolongamentos citoplasmáticos, que foram observados no GC, ocorreram também no GD.

As alterações foram observadas em todos os momentos e foram mais acentuadas em animais do M<sub>4</sub> e do M<sub>5</sub>.

#### **1.2.5. Camada plexiforme externa (CPE)**

Houve aumento de glicogênio, lisossomos e corpos densos em axônios e prolongamentos citoplasmáticos, principalmente, de células de Müller perivasculares. Algumas sinapses mostraram-se bastante eletrtransparentes, contendo debris celulares, "figuras de Mielina" e diminuição do número de vesículas sinápticas (Figura 8c). As alterações ocorreram em todos os momentos, sendo mais acentuadas em M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub>. Em M<sub>5</sub>, formações arredondadas de diversos padrões de eletrondensidade ocuparam o citosol de alguns prolongamentos citoplasmáticos.

#### **1.2.6. Camada nuclear interna (CNI)**

Em todos os tipos celulares, foi observado núcleo com cromatina menos densa e com os mesmos agregados de cromatina vistos nos núcleos da CNE (Figura 10a). No citoplasma de células horizontais, bipolares e amácrinas foi constante o encontro de lisossomos, corpos residuais, glicogênio, debris celulares e rarefação citoplasmática (Figura 10b, c, d, e, f). Foram as células de Müller, porém, que apresentaram alterações mais frequentes e intensas, principalmente as próximas aos vasos. Algumas apresentaram citoplasma totalmente preenchido por lisossomos e corpos residuais ovóides, de diferentes padrões de eletrondensidade. Essas alterações ocorreram em todos os momentos, sendo mais comuns em animais do M<sub>4</sub> e do M<sub>5</sub>.

### **1.2.7. Camada plexiforme interna (CPI)**

Observou-se rarefação citoplasmática, mitocôndrias edemaciadas e aumento de glicogênio, corpos residuais, lisossomos, debris celulares, e "figuras de Mielina" nos axônios e nos prolongamentos citoplasmáticos amácrinos, ganglionares, microgliais e principalmente, nos das células de Müller ou nos localizados próximo à vasos. Alguns prolongamentos citoplasmáticos tiveram perda total das organelas citoplasmáticas, sendo estas substituídas por estruturas eletrondensas, circulares ou ovóides (Figura 12 a,b).

Essas alterações ocorreram em todos os momentos, sendo mais intensas em M<sub>5</sub>. Notamos em M<sub>5</sub>, geralmente na região perivascular, a presença de edema celular e de espaços eletrtransparentes irregulares entre os prolongamentos citoplasmáticos.

### **1.2.8. Camada Ganglionar (CG)**

As células ganglionares e microgliais de animais do GD (Figura 2c), apresentaram as mesmas alterações descritas para as demais células retínicas, ou seja: núcleos com cromatina rarefeita e agregados circulares eletrondensos, citoplasma com menor número de organelas e exuberância em lisossomos e corpos residuais heterogêneos (Figura 13 c,d). Nas células ganglionares observou-se, também, edema mitocondrial e vacúolos intracitoplasmáticos, principalmente na face celular voltada para a membrana limitante interna (Figura 14a). Observaram-se, ainda, espaços eletrtransparentes no meio extracelular, geralmente próximo a vasos (Figura 14b); alguns prolongamentos citoplasmáticos de células de Müller repletos de lisossomos, corpos residuais e formações eletrondensas (Figura 14b, c).

As alterações ocorreram em todos os momentos, mas foram mais frequentes em M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub>.

### **1.2.9. Camada de fibras nervosas (CFN)**

Nos axônios e nos prolongamentos citoplasmáticos observou-se: rarefação citoplasmática, debris, grânulos de glicogênio e lisossomos. Alguns feixes foram totalmente substituídos por formações multivesiculares eletrondensas, ou "figuras de Mielina", dando um aspecto mais eletrondenso à CFN dos animais deste grupo. Algumas vezes, espaços eletrtransparentes entre feixes de axônios (Figura 14b).

As alterações ocorreram em todos os momentos experimentais, intensificando-se em M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub>.

### **1.2.10. Membrana Limitante interna (MLI)**

Não observaram-se alterações estruturais ou ultraestruturais na MLI do GD, em todos os momentos de sacrifício (Figura 13d).

## **1.3. GRUPO DIABÉTICO TRATADO**

### **1.3.1. Epitélio Pigmentar (EP).**

A apresentou-se com padrão semelhante ao do GC, exceto pela presença de 2 vasos que foram observados em um animal do M<sub>5</sub>. Próximo a um desses vasos, foram observadas circunvoluções semelhantes a invaginações basais ou a pregas apicais (Figura 4e).

### **1.3.2. Cones e Bastonetes (CB)**

Observou-se que os CB do GT tiveram características semelhantes aos do GC. Os vacúolos intracitoplasmáticos e os "cistos glicogênicos" foram menos frequentes no GT que no GD, em todos os momentos de sacrifício (Figuras 2f; 6d; 7d).

### **1.3.3. Membrana Limitante externa (MLE)**

A MLE do GT não mostrou diferenças estruturais ou ultraestruturais, nos diferentes momentos experimentais (Figura 7d).

### **1.3.4. Camada nuclear externa (CNE)**

A maioria dos núcleos de CB apresentou características semelhantes aos do GC. Foram encontrados alguns com distribuição heterogênea da cromatina e com agregados eletrondensos semelhantes aos observados no GD, principalmente em animais do M<sub>4</sub> e do M<sub>5</sub> (Figuras 7d; 8d).

No citoplasma não foram encontrados lisossomos ou "cistos glicogênicos" .

### **1.3.5. Camada plexiforme externa (CPE)**

Presença de corpos residuais, debris celulares e diminuição de vesículas sinápticas em menor intensidade que os animais do GD, em todos os momentos de sacrifício (Figura 8d).

### **1.3.6. Camada nuclear interna (CNI)**

Em todos os momentos de sacrifício, os animais do GT apresentaram células com características semelhantes às do GC, contendo, porém, maior quantidade de corpos densos e lisossomos que aquelas (Figuras 8d; 11a, b).

### **1.3.7. Camada plexiforme interna (CPI)**

Nos prolongamentos citoplasmáticos, especialmente de células de Müller, encontraram-se escassos lisossomos e corpos residuais. Notou-se menor

quantidade de alterações no GT que no GD, em todos os momentos experimentais (Figura 12c, d).

### **1.3.8. Camada Ganglionar (CG)**

As células ganglionares e microgliais do GT apresentaram diminuição das organelas do citosol, e menores acúmulos de corpos residuais e lisossomos que os observados no GD, em todos os momentos de sacrifício (Figura 14d, e).

### **1.3.9. Camada de fibras nervosas (CFN)**

Observou-se a presença de glicogênio, lisossomos e corpos residuais, com menor frequência que no GD, em todos os momentos experimentais (Figura 14d, e).

### **1.3.10. Membrana limitante interna (MLI)**

Não observaram-se alterações estruturais ou ultraestruturais na MLI do GT, em todos os momentos de sacrifício (Figura 14e).

## **2 VASCULATURA RETÍNICA**

### **2.1. Grupo Controle**

Os vasos sangüíneos retinianos foram vistos, à microscopia óptica, formados por células endoteliais, envoltas por pericitos. Usando coloração específica (orceína), pudemos notar a presença de fibra elástica, apenas na parede de arteríolas.

Estes vasos estão distribuídos em 2 plexos, que se comunicam por meio de capilares:

a. Plexo Superficial: os vasos estão localizados na CG e na CFN. Nesse plexo foram encontrados capilares, arteríolas e vênulas que são, em geral, maiores que os do plexo profundo.

b. Plexo Profundo: os vasos estão localizados na CPE, e na CNI. Não foram observados vasos nas camadas situadas além da CPE.

Ao exame ultraestrutural, constatou-se que os capilares retinianos são do tipo contínuo, estando as células endoteliais unidas umas às outras por meio de junções íntimas. Próximo a essa união, há projeção em forma de "dedo-de-luva", em direção à luz vascular (Figura 15b). As células endoteliais possuem outras projeções menores, em direção à luz, não associadas à união intercelular.

As células endoteliais possuem núcleo alongado no sentido da luz capilar, cromatina condensada e bordas de contornos irregulares. O citoplasma endotelial possui mitocôndrias, RER, ribossomos, aparelho de Golgi, escassos corpos densos e, às vezes, centríolo. Vesículas pinocitóticas foram vistas próximas às membranas plasmáticas, externa e interna, bem como no citoplasma endotelial. Essas vesículas são mais numerosas junto à membrana plasmática externa e nos vasos do plexo superficial (Figura 15a).

Revestindo externamente as células endoteliais, há membrana basal (MB) e pericitos. Os pericitos envolvem total ou parcialmente as células endoteliais, possuem núcleo com cromatina mais densa e são ricos em organelas citoplasmáticas, as mesmas organelas observadas em células endoteliais, inclusive com inúmeras vesículas pinocitóticas (Figura 15c, d).

No citoplasma de células endoteliais e pericíticas de animais do M<sub>4</sub> e do M<sub>5</sub>, observaram-se: aumento de glicogênio, vesículas intracitoplasmáticas, corpos densos e vacúolos de conteúdo heterogêneo.

A MB do capilar retiniano do rato é formada por uma faixa osmiofílica central (lâmina densa), que fica entre duas faixas claras (lâmina rara). Há a

membrana basal interna (MBI), que fica entre a célula endotelial e a pericítica. Envolvendo externamente a célula endotelial e o pericito, há a membrana basal externa (MBE) (Figura 15b).

Nos vasos maiores, isto é, arteríolas e vênulas encontradas no plexo superficial, há envoltórios dispostos em mais do que uma camada, como se houvesse pericito sobre pericito. Existem, ainda, arteríolas envoltas por camada única de célula muscular lisa, fibras colágenas e adventícia perivascular (Figura 15d).

Observou-se, em animais do M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub>, a presença de acúmulos osmiofílicos heterogêneos, localizados interna ou externamente a MB (Figura 15f) . Um animal do M<sub>5</sub>, apresentou espaços claros e eletrtransparentes dentro da MBE. Raras vezes, observaram-se projeções da MBE, não acompanhadas de células endoteliais ou pericíticas, em direção às células gliais adjacentes (Figura 15e).

A MBE está aposta às células gliais, não havendo espaços perivasculares.

Hemácias, células granulocíticas e plaquetas foram observadas dentro da luz de alguns vasos, porém nunca no espaço extravascular.

## **2.2. Grupo Diabético**

As alterações vasculares foram semelhantes no plexo superficial e profundo e acentuaram-se progressivamente, de M<sub>1</sub> até M<sub>5</sub>.

As células endoteliais apresentaram núcleo com dispersão da cromatina. No citoplasma, notaram-se algumas gotas lipídicas, mitocôndrias edemaciadas, acúmulo de glicogênio, corpos densos e lisossomos, vacúolos contendo "figuras de Mielina" e aumento do número de vesículas pinocitóticas (Figura 16a, d).

Alguns pericitos apresentaram núcleos enormes e rarefeitos, e agregados de cromatina. O citoplasma pericítico mostrou-se mais desorganizado que o de células endoteliais, contendo mitocôndrias "endemaciadas", muitos corpos densos,

vacúolos intracitoplasmáticos, acúmulos de glicogênio e maior número de vesículas pinocitóticas. A partir de M<sub>2</sub>, notaram-se pericitos com intenso edema citoplasmático e menor número de organelas. Em M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub> observaram-se pericitos desorganizados e hialinização citoplasmática completa, ficando o compartimento pericítico preservado, porém totalmente vazio (Figuras 16a, d, e; 17b).

Os animais diabéticos apresentaram alterações evidentes da MB (Figuras 16b, c, f; 17a, b). Observou-se espessamento não homogêneo, mais acentuado na MBE que reveste os pericitos e nos locais próximos à união entre MBE e MBI. Os acúmulos osmiofílicos no GD foram observados a partir de M<sub>1</sub>, sendo mais freqüentes e mais grosseiros que os dos animais do GC. Quanto aos espaços eletrtransparentes, observados apenas em um animal do GC no M<sub>5</sub>, no GD foram observados mais freqüentemente e a partir de M<sub>3</sub>.

As projeções da MBE em direção a células vizinhas, ocorreram no GD, já em animais de M<sub>1</sub>, e foram mais freqüentes que no GC (Figura 16c).

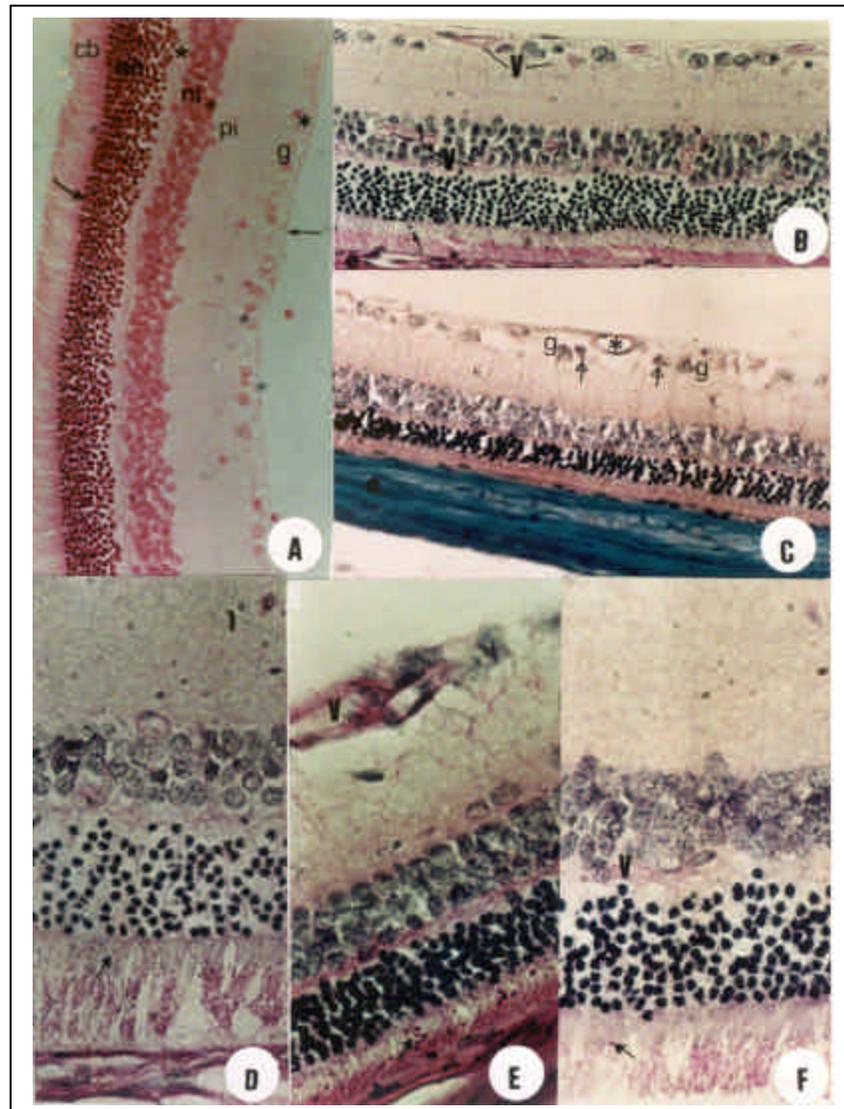
Na região perivascular foram evidentes as alterações em prolongamentos citoplasmáticos de células adjacentes, tais como edema, acúmulo de corpos residuais, lisossomos, granulações eletrondensas e glicogênio, principalmente em animais de M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub>.

No lúmen de muitos vasos observaram-se hemácias, células granulocíticas e plaquetas. Após M<sub>4</sub>, observou-se alguns vasos totalmente preenchidos por debris celulares.

### **2.3. Grupo diabético tratado**

Os animais do GT apresentaram, em células endoteliais e pericíticas, corpos residuais lisossômicos, glicogênio, vacúolos com "figuras de Mielina" e vesículas pinocitóticas. Observaram-se, também, espessamento da MB, presença de depósitos eletrondensos em MB e prolongamentos de MB perivascular. Todas estas alterações

foram muito mais discretas no GT, quando comparadas às que ocorreram no GD, em todos os momentos experimentais (Figura 17c, d, e, f).



**FIGURA 2a:-** Retina de rato normal. Camada de cones e bastonetes (cb), nuclear externa (ne), plexiforme externa (\*), nuclear interna(ni), plexiforme interna (pi), ganglionar (g) e fibras nervosas (\*). A membrana limitante externa (seta curva) e membrana limitante interna (seta reta) são tênues linhas eosinofílicas (X 240 GC- Rato 13-M<sub>1</sub>-coloração de HE).

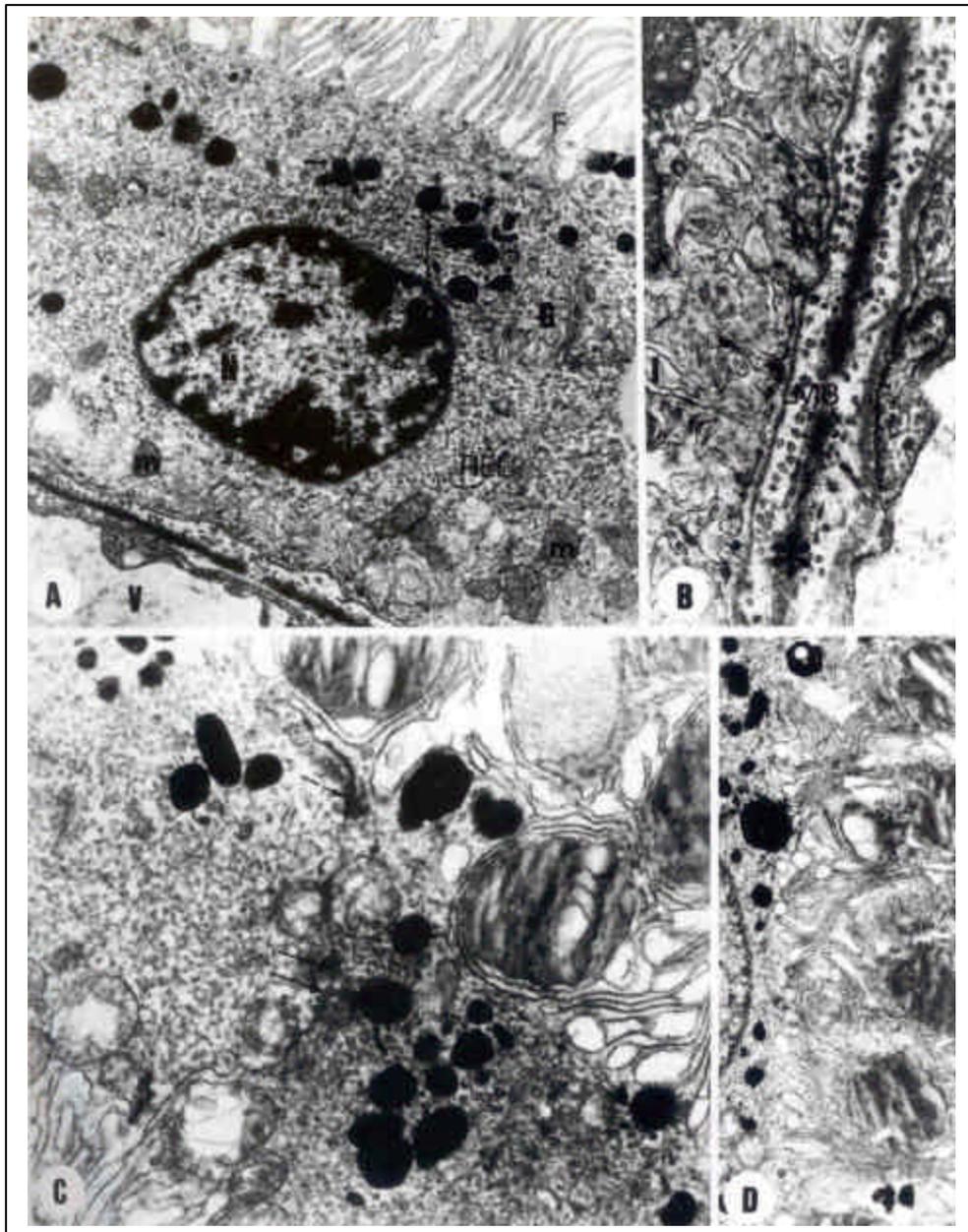
**FIGURA 2b:-** Retina de rato diabético. Observar a localização dos vasos (v) e a grande quantidade de glicogênio (seta). Epitélio pigmentar (\*) (X 240 GD rato 37-M<sub>5</sub>- coloração de PAS).

**FIGURA 2c:-** Retina de rato diabético. A parede da arteríola (\*) apresenta fibra muscular. Células ganglionares (g) e microgliais (seta) (X 240 GD rato 39 -M<sub>5</sub>-coloração de orceína).

**FIGURA 2d:-** Retina de rato normal. Observar a quantidade de glicogênio(seta)(X 590 GC-Rato 10-M<sub>2</sub>-coloração de PAS).

**FIGURA 2e:-** Retina de rato diabético. A quantidade de glicogênio (seta) é maior que no GC. Vaso (V)(X 590 GD rato 79-M<sub>3</sub>-coloração de PAS).

**FIGURA 2f:-** Retina de rato diabético tratado. O glicogênio (seta) é escasso.Vaso(V)(X 590 GT-rato 152-M<sub>5</sub>-coloração de PAS).



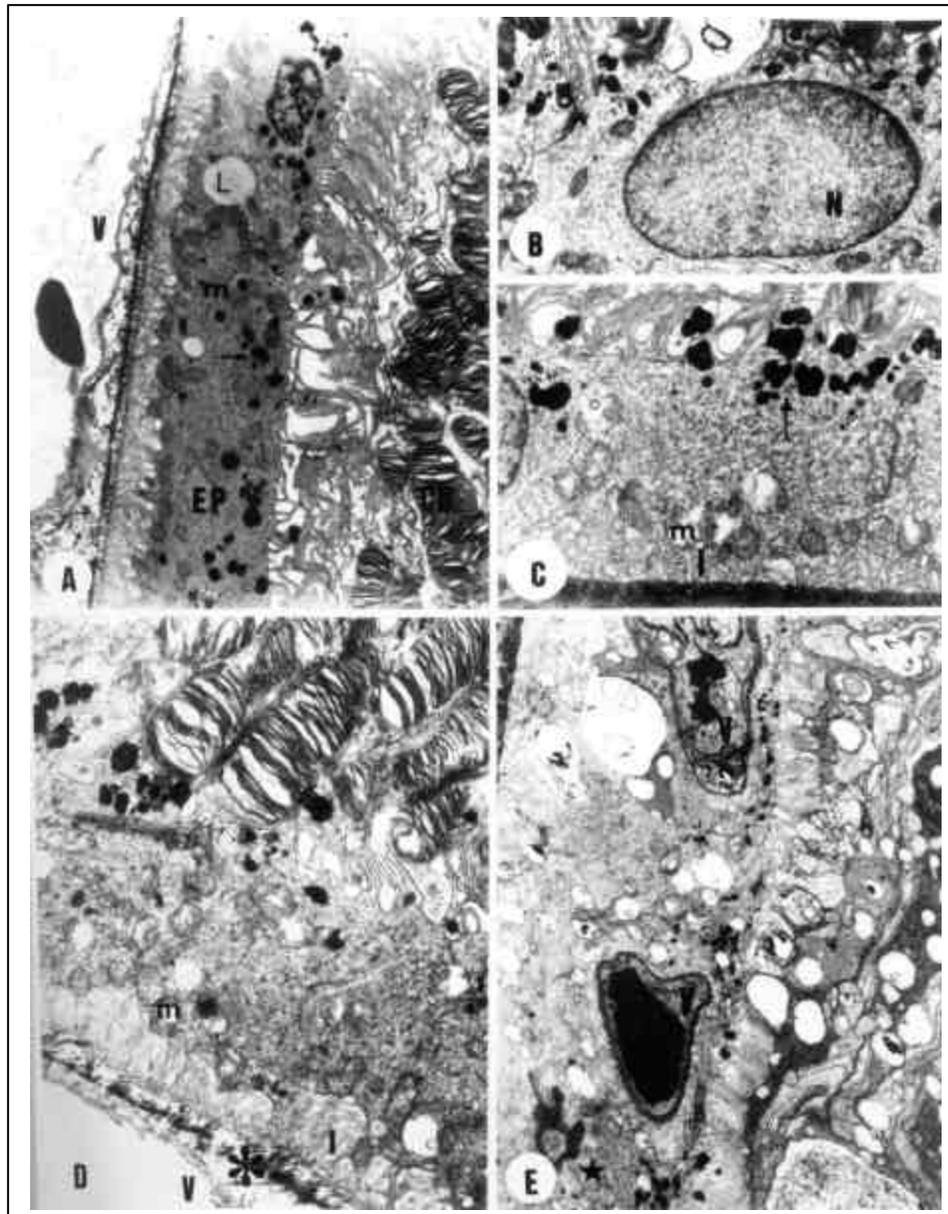
**FIGURA 3 a,b,c,d:- Epitélio pigmentar de rato normal (GC).**

3.a:- Observar o núcleo (N) contendo cromatina condensada próxima à carioteca. No citoplasma, exuberância de retículo endoplasmático liso (REL); mitocôndrias (m) próximas à base celular; Golgi(G), grânulos pigmentares e corpos densos (seta) concentrados próximos ao ápice celular. "Franjas" (F) apicais (X 16.500 - GC rato 19 - M<sub>1</sub>).

3.b:- Base da célula do epitélio pigmentar retiniano e Membrana de Bruch (\*). A membrana basal (MB) não acompanha as invaginações (I) da membrana plasmática (X 36.000 - GC rato 10 - M<sub>4</sub>).

3.c:- Face intercelular de células do epitélio pigmentar, onde se nota junção íntima (seta), seguida por junções aderentes (dupla seta) (X 23.100 - GC rato 19 - M<sub>1</sub>).

3.d:- Detalhe da face apical de células do epitélio pigmentar mostrando as "franjas" envolvendo discos dos segmentos externos de cones e bastonetes (X 46.800 - GC rato 11 - M<sub>5</sub>).



**FIGURA 4a,b,c,d:- Epitélio pigmentar de rato diabético (GD).**

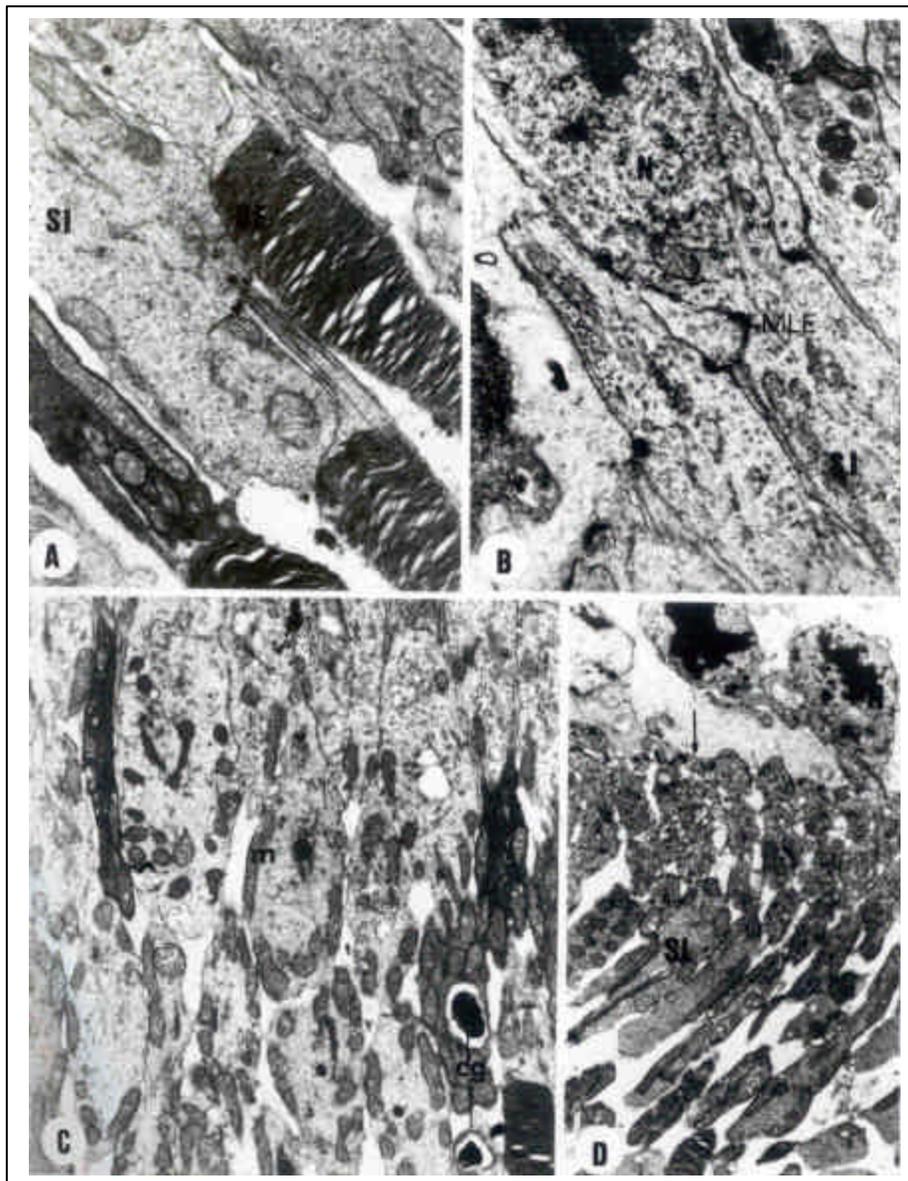
4.a:- Epitélio pigmentar (EP) retiniano e segmentos externos de cones e bastonetes (CB). Mitocôndrias (m) concentradas na base e superfície lateral das células. Lipídeo (L). Os grânulos de pigmento e corpos densos (seta) estão em maior número e distribuídos por todo o citoplasma. Vaso (V) da coróide (X 6.500 - GD rato 79 - M<sub>3</sub>).

4.b:- Núcleo (N) de célula pigmentar mostrando rarefação citoplasmática (X 10.000 - GD rato 23 - M<sub>4</sub>).

4.c:- As invaginações (I) basais são menores e em menor quantidade nestes animais. Mitocôndrias (M). Pigmentos e corpos densos (seta) (X 10.000 - GD rato 52 - M<sub>4</sub>).

4.d:- Observar o relacionamento dos segmentos externos dos cones e bastonetes com o EP. Mitocôndrias (m). Invaginações basais (I). Membrana de Bruch (\*). Vaso (V) da coróide (X 13.000- GD rato 52 - M<sub>4</sub>).

4e:- Epitélio pigmentar de rato diabético tratado (GT). Presença de vasos (V) no epitélio pigmentar e circunvoluções no citoplasma celular (\*) (X 6.500 - GT rato 291 - M<sub>5</sub>).



**FIGURA 5 a,b,c,d:- Camada de cones e bastonetes (CB) de rato normal (GC).**

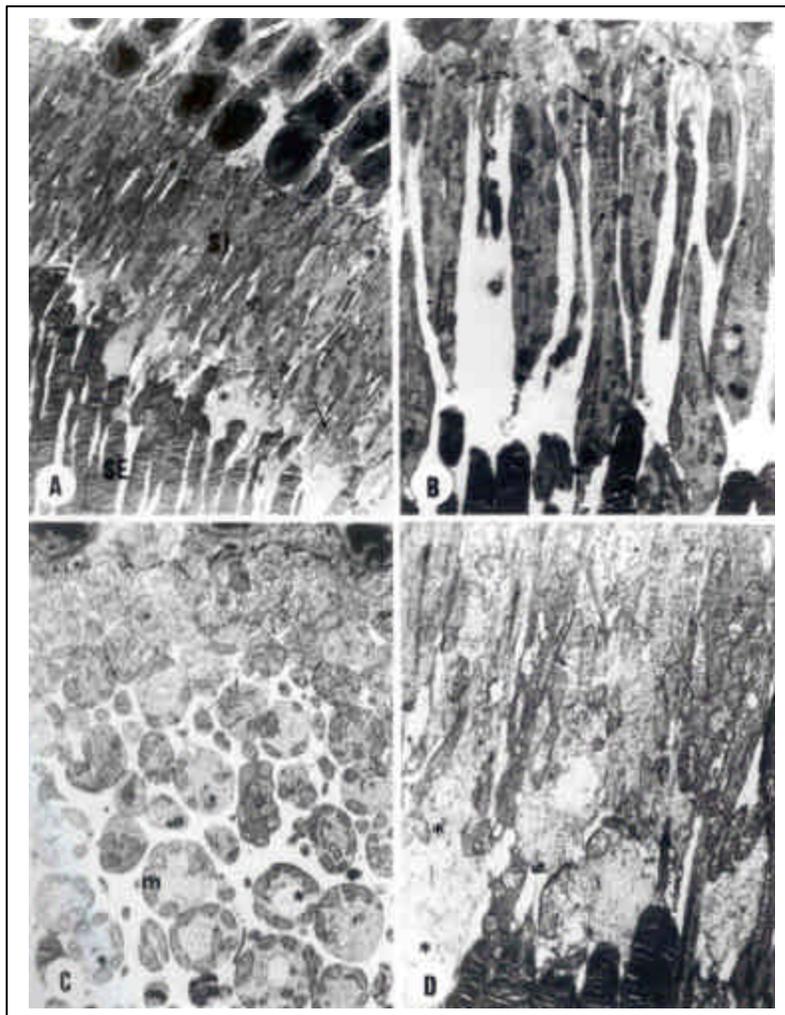
5.a:- Segmento externo (SE) de fotorreceptor unido ao segmento interno (SI) através de cílio conectante (seta) (X 21.000 - GC - rato 10 - M<sub>4</sub>).

5.b:- Segmento interno de fotorreceptor (SI). Membrana limitante externa (MLE)

que delimita a camada de CB e a camada nuclear externa, onde estão os núcleos (N) de CB (X 21.000-GC rato 10 -M<sub>4</sub>).

5.c:- Observar os "cistos glicogênicos" (cg) no segmento interno de fotorreceptores. As mitocôndrias (m) são alongadas e dispostas próximo à membrana plasmática (X 10.000 - GC rato 15 - M<sub>4</sub>).

5.d:- Segmento interno (SI) de fotorreceptores. Membrana limitante externa (seta). Núcleos (N) da camada nuclear externa (X 6.500 - GC rato 3 - M<sub>2</sub>).



**FIGURA 6 a,b,c:- Camada de CB de rato diabético (GD).**

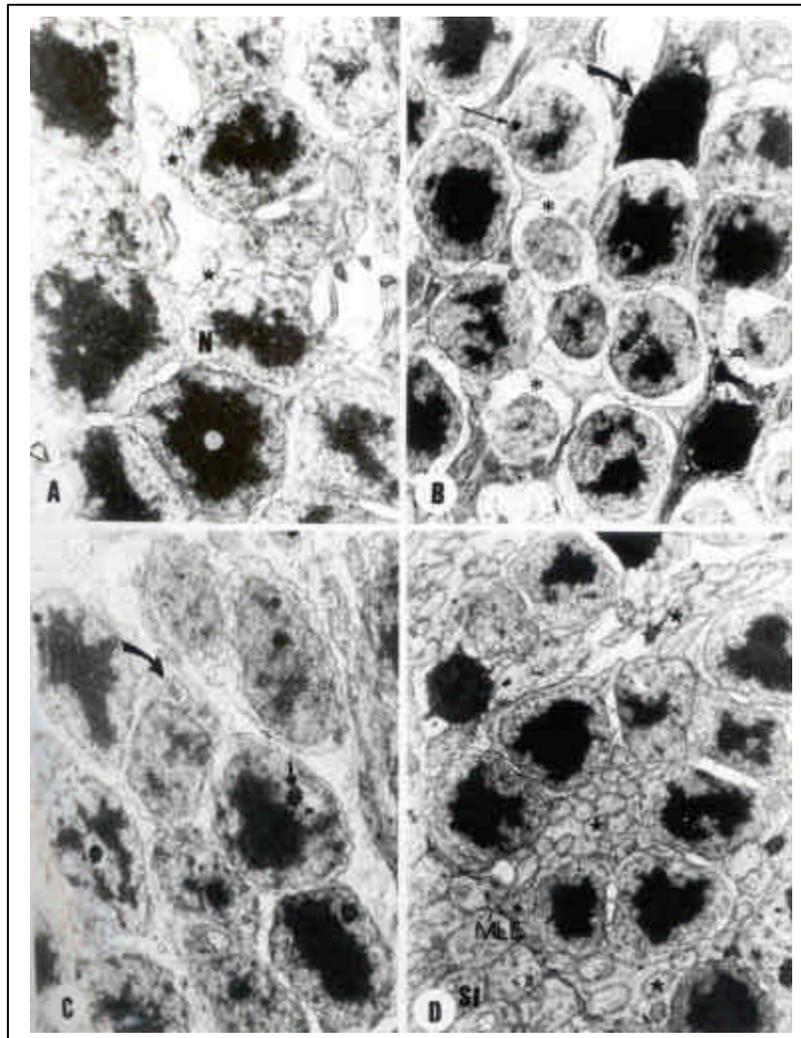
6.a:- Segmento externo (SE) e interno (SI) de CB. Observar a presença de vacúolos(\*)e corpos densos(seta) (X 2.750- GD rato 83-M<sub>3</sub>).

6.b:- Fotorreceptores mais espaçados entre si. Corpos densos(seta). Vacúolos (\*) com "figuras de Mielina" (X 21.000 - GD rato 37 - M<sub>5</sub>).

6.c:- As mitocôndrias (m) apresentam-se heterogêneas em forma e tamanho, com diminuição do número de cristas. Vacúolos (\*) intracitoplasmáticos (X 6.500 - GD rato 39 - M<sub>5</sub>).

6d:- Camada de CB de rato diabético tratado (GT).

Presença de escassos vacúolos intracitoplasmáticos (\*) (X 10.000 - GT rato 172 - M<sub>1</sub>).



**FIGURA 7a:- Camada nuclear externa (CNE) de rato normal (GC)**

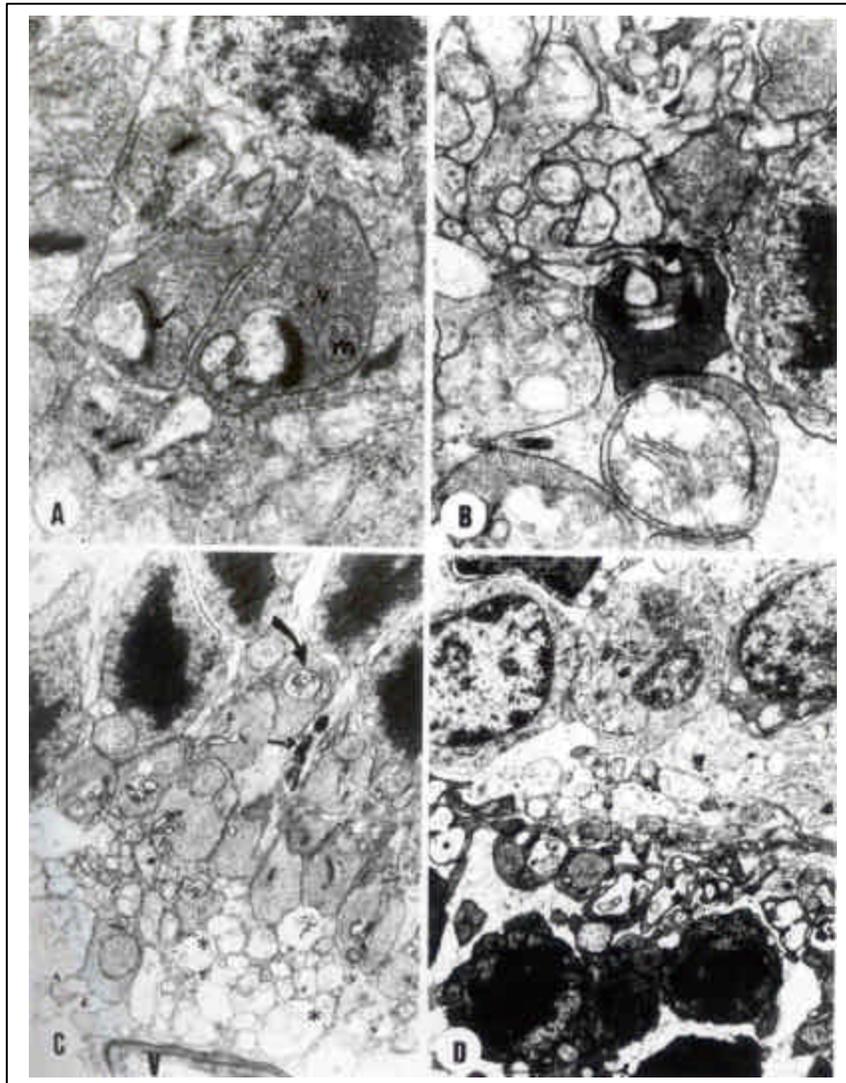
Observar a cromatina nuclear condensada na região central do núcleo (N), que é envolto por estreita faixa de citoplasma (\*). Prolongamentos citoplasmáticos (\*) (X 10.000 - GC rato 15 - M<sub>4</sub>).

**FIGURA 7 b,c:- CNE de rato diabético (GD).**

7.b:- Cromatina com distribuição irregular, apresentando agregados eletrondensos (seta reta) e núcleos picnóticos (seta curva). O citoplasma ao redor dos núcleos é rarefeito(\*) (X 6.500 - GD rato 23 - M<sub>4</sub>).

7.c:- Observar os agregados eletrondensos(seta reta) nos núcleos, e a presença de "cisto glicogenico" (seta curva) no citoplasma (X 8.000 - GD rato 41 - M<sub>1</sub>).

7 d:- CNE de rato diabético tratado (GT) - alguns núcleos distribuição heterogênea da cromatina. Prolongamentos citoplasmáticos (\*). Membrana limitante externa (MLE) e segmento interno (SI) de cones e bastonetes (X 8.000 - GT rato 63 - M<sub>1</sub>).



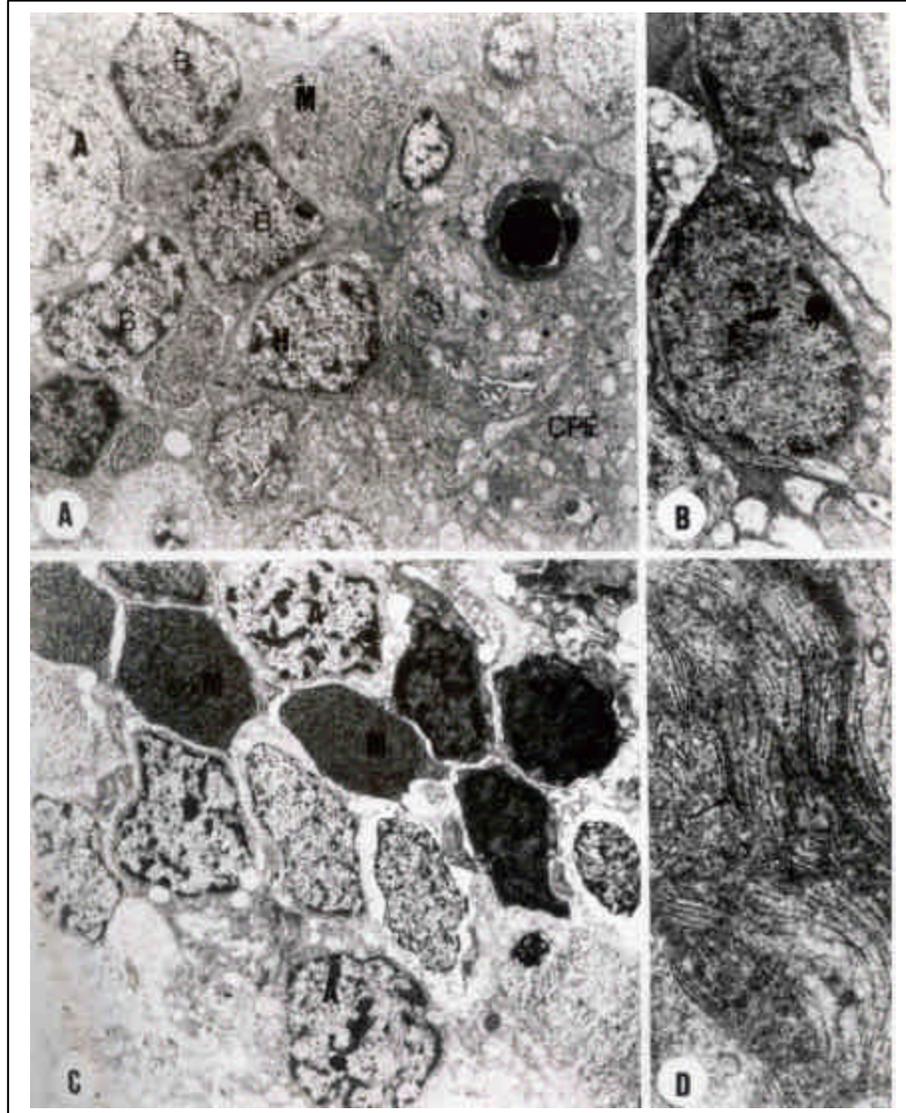
**FIGURA 8 a,b:- Camada plexiforme externa (CPE) de rato normal(GC).**

8.a:- Terminação sináptica de cone onde observam-se mitocôndrias (m) e lamela sináptica (seta), em meio a inúmeras vesículas sinápticas (v) (X 21.000 - GC rato 100 - M<sub>4</sub>).

8.b:- Terminação sináptica de bastonetes, com lamelas sinápticas (seta) perpendiculares à sinápsse. Observar a riqueza de vesículas sinápticas (X 21.000 - GC rato 15 - M<sub>4</sub>).

8 c:- CPE de rato diabético (GD) - presença de corpos densos (seta pequena) e "cistos glicogênicos" (seta curva) nos prolongamentos citoplasmáticos adjacentes às sinapses. Algumas terminações, com diminuição das vesículas sinápticas e contendo debris celulares e "figuras de Mielina" (\*). Vaso (V) (X 8.000 - GD rato 83 - M<sub>3</sub>).

8 d:- CPE de rato diabético tratado (GT) - as alterações observadas são menos intensas que as do GD. Acima, núcleos da camada nuclear interna e, abaixo, núcleos da camada nuclear externa (X 5000 - GT rato 97 - M<sub>3</sub>).



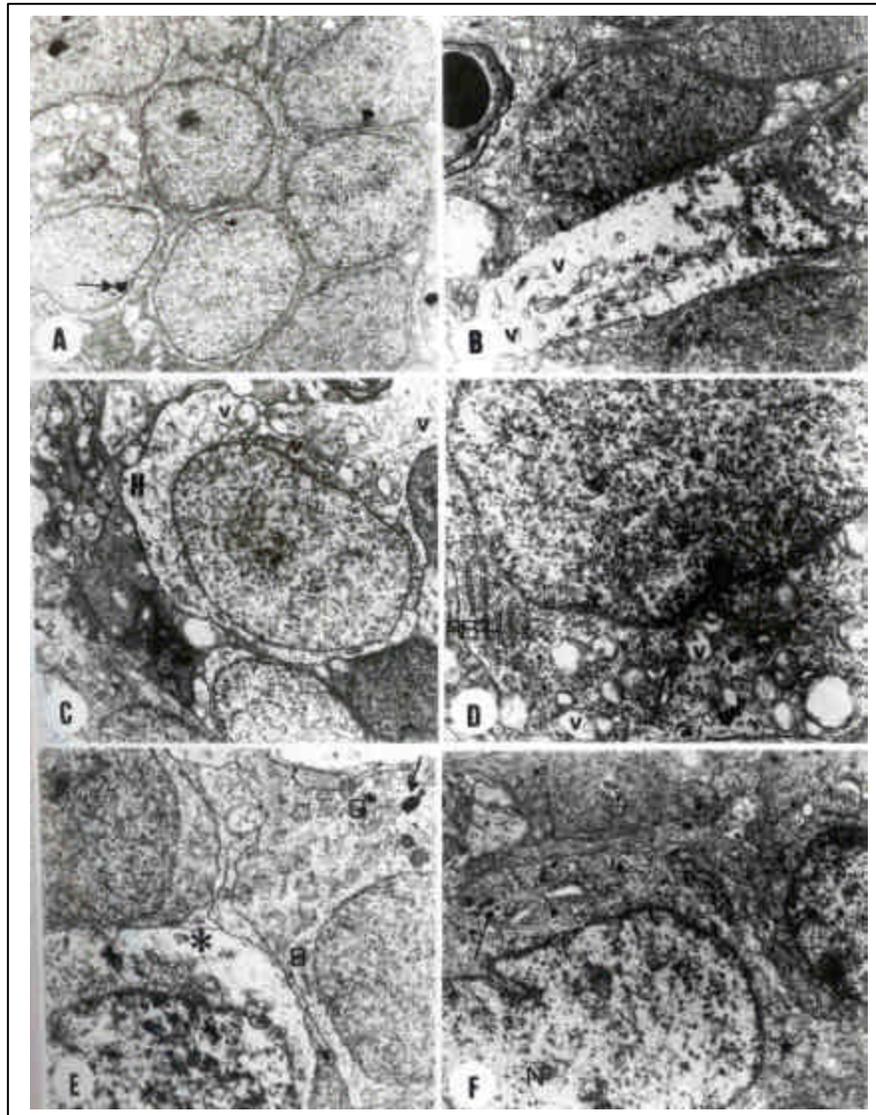
**FIGURA 9 a,b,c,d:- Camada nuclear interna (CNI) de rato normal(GC).**

9.a:- Na CNI encontramos núcleos de células horizontais (H), bipolares (B), amácrinas (A) e de Müller (M). Vaso (V). Camada plexiforme externa (CPE) (X 5.000 - GC rato 1 - M<sub>2</sub>).

9.b:- Célula da CNI com nucléolo evidente (X 9.400- GC rato 26-M<sub>3</sub>).

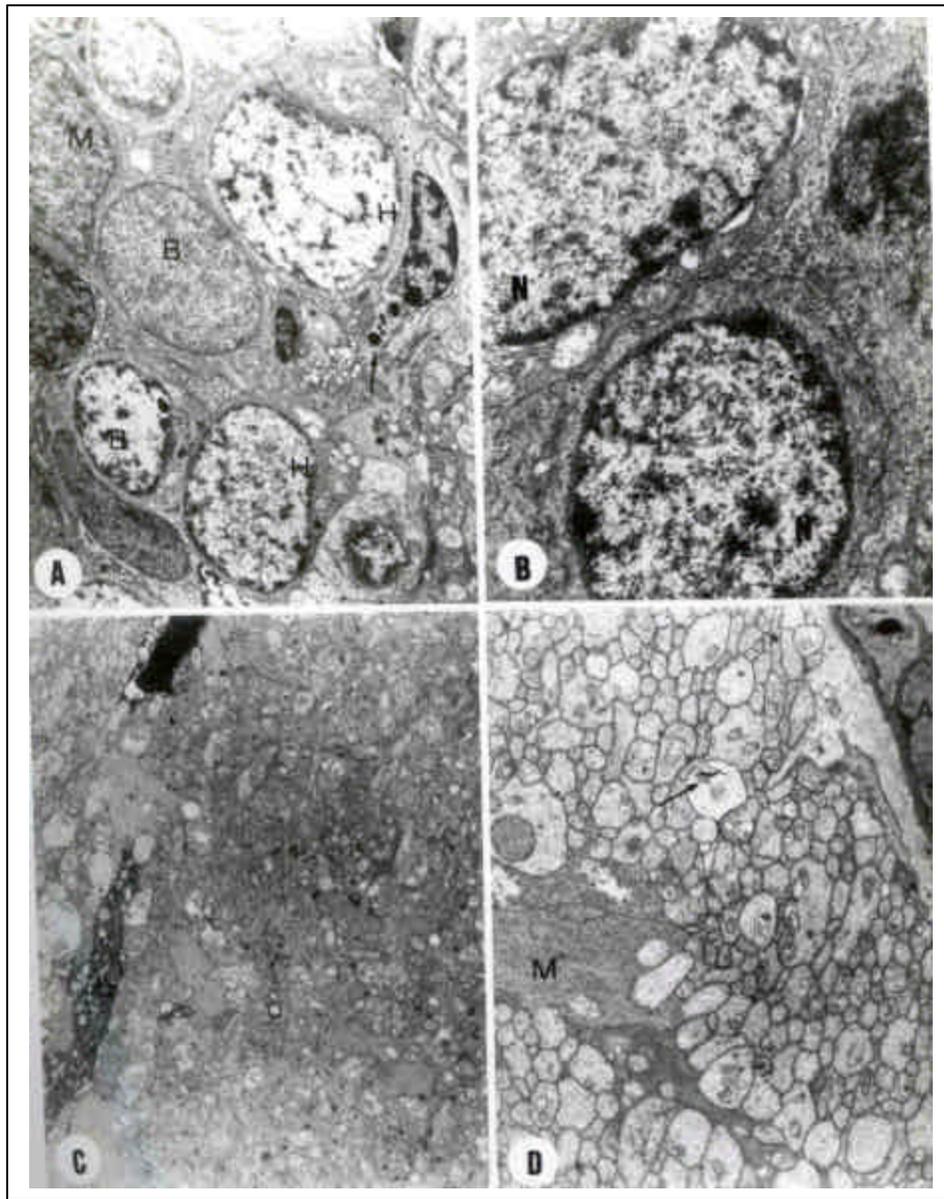
9.c:- Núcleos de células bipolar (B), amácrina (A) e de Müller (M).(X 6.500 - GC rato 15 - M<sub>4</sub>).

9.d:- Axônio rico em microtúbulos (seta) (X 5.000 - GC rato 26-M<sub>3</sub>).



**FIGURA 10 a,b,c,d,e,f:- Camada nuclear interna (CNI) de rato diabético (GD).**

- 10.a:- Núcleos da CNI apresentam cromatina menos condensada e contendo agregados eletrondensos excêntricos (seta) (X 6.500- GD rato 152 - M<sub>5</sub>).
- 10.b:- Axônio de célula bipolar com rarefação citoplasmática e vacúolos (v). Vaso (V) (x 10.000 - GD rato 52 - M<sub>4</sub>).
- 10.c:- Célula horizontal (H) repleta de vacúolos citoplasmáticos(v), alguns com "figuras de Mielina" (X 8.000-GD rato 52-M<sub>4</sub>).
- 10.d:- Célula horizontal contendo corpos densos (seta) e vacúolos citoplasmáticos (v). Retículo endoplasmático rugoso (RER) (X 6.500 - GD rato 41 - M<sub>1</sub>).
- 10.e:- Célula bipolar (B) contendo corpos densos (seta). Golgi (G). Rarefação citoplasmática (\*) (X 13.000 - GD rato 52 - M<sub>4</sub>).
- 10.f:- Célula amácrina - núcleo (N) com indentação característica. Grande quantidade de corpos densos (seta) e glicogênio livre (\*) (X 10.000 - GD rato 39 - M<sub>5</sub>).



**FIGURA 11 a,b:- Camada nuclear interna (CNI)de rato diabético tratado (GT).**

11.a:- Célula horizontal (H), bipolar (B) e de Müller (M). Observar a presença de corpos densos (seta) (X 6.500-GT rato 62- M<sub>1</sub>).

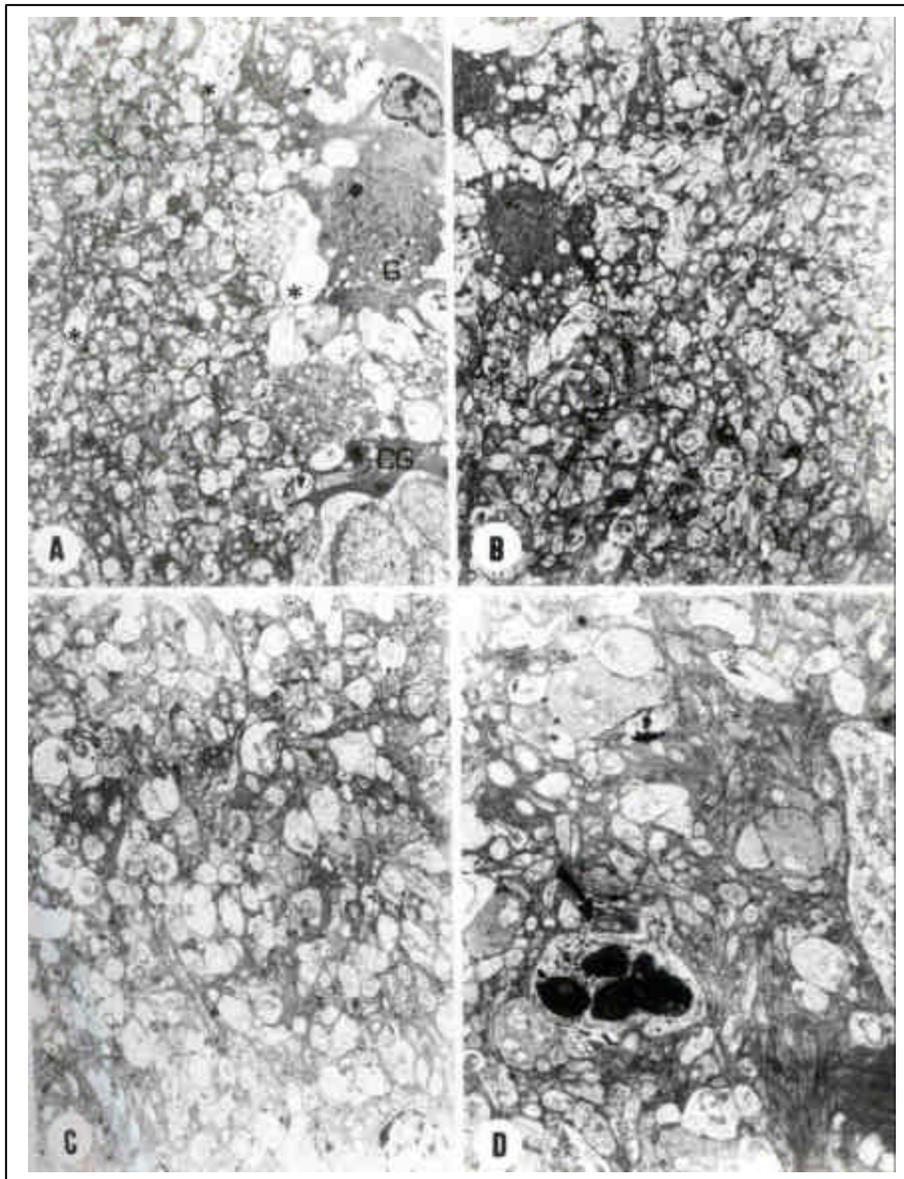
11.b:- Distribuição da cromatina nuclear (N) e citoplasma, semelhante ao de rato normal (X 13.000 - GT rato 62 - M<sub>1</sub>).

11 c,d:- Camada plexiforme interna(CPI) de rato normal (GC).

11.c:- Os axônios e prolongamentos citoplasmáticos formam um "emaranhado".

Célula da glia perivascular (\*) (X 3.600 - GC rato 1 - M<sub>2</sub>).

11.d:- Axônios e prolongamentos, de formato circular ou ovóide. Raramente, corpos densos e vacúolos com "figuras de Mielina" (seta). Prolongamento citoplasmático de células de Müller (M). Arteríola (A) (X 10.000 - GC rato 11 - M<sub>4</sub>).



**FIGURA 12 a,b:- Camada plexiforme interna (CPI) de rato diabético (GD).**

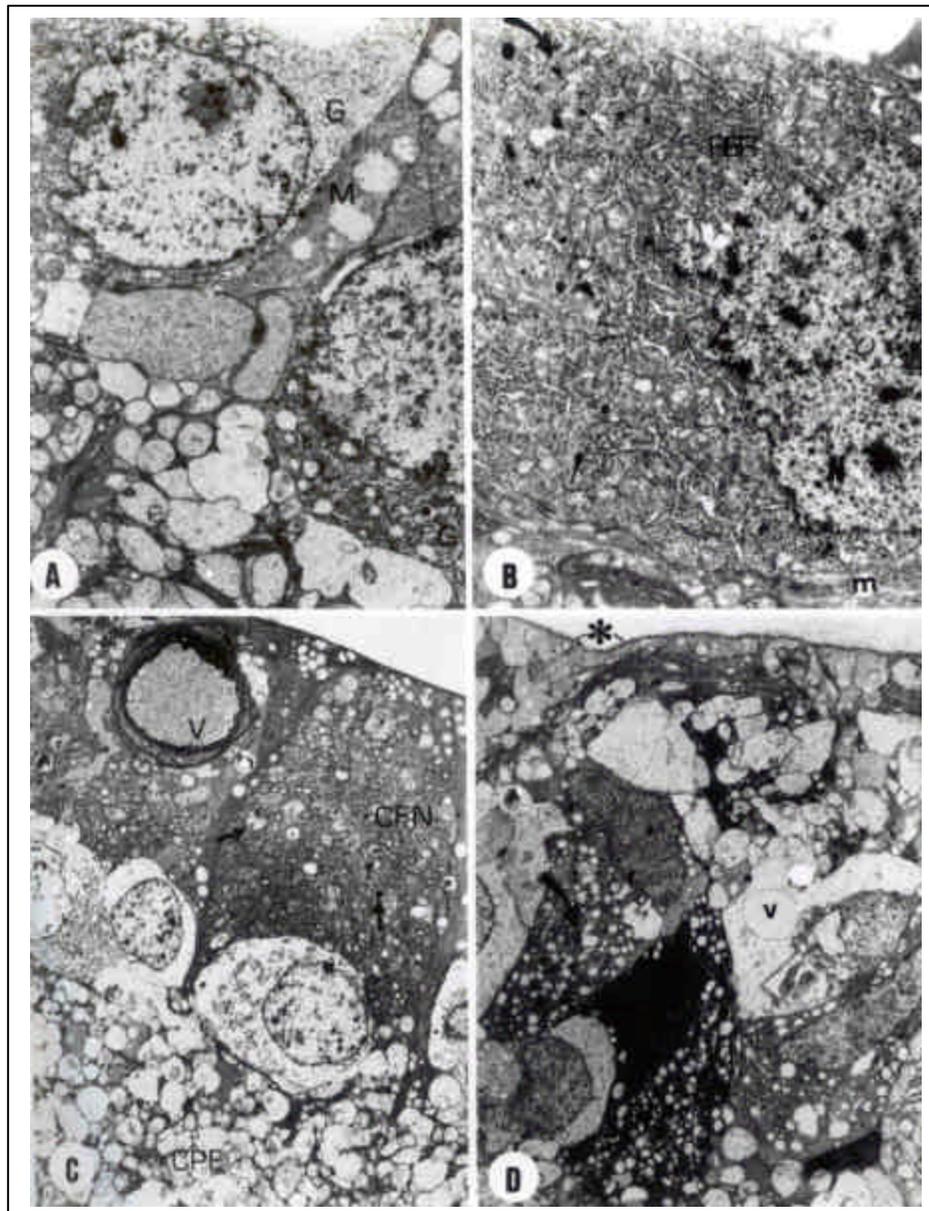
12.a:- Observar rarefação citoplasmática (\*) e muitos axônios com "figuras de Mielina". Camada ganglionar(CG).Célula ganglionar (G) (X 3.300 - GD rato 83 - M<sub>3</sub>).

12.b:- Poucos axônios e prolongamentos citoplasmáticos mantêm o aspecto normal (X 3.300 - GD rato 83 - M<sub>3</sub>).

**FIGURA 12 c,d:- Camada plexiforme interna (CPI) de rato diabético tratado (GT).**

12.c:- Subjetivamente, menor número de alterações que no GD (X 6.500 - GT rato 62 - M<sub>1</sub>).

12.d:- Observar prolongamentos citoplasmáticos semelhantes aos do GC e um deles repleto de corpos residuais (seta) (X 6.500 - GT rato 11 - M<sub>3</sub>).



**FIGURA 13 a,b:- Camada ganglionar (CG) de rato normal (GC).**

13.a:- Células ganglionares (G) entremeadas por prolongamento citoplasmático de célula de Müller (M) (X 6.200-GC rato 13-M<sub>5</sub>).

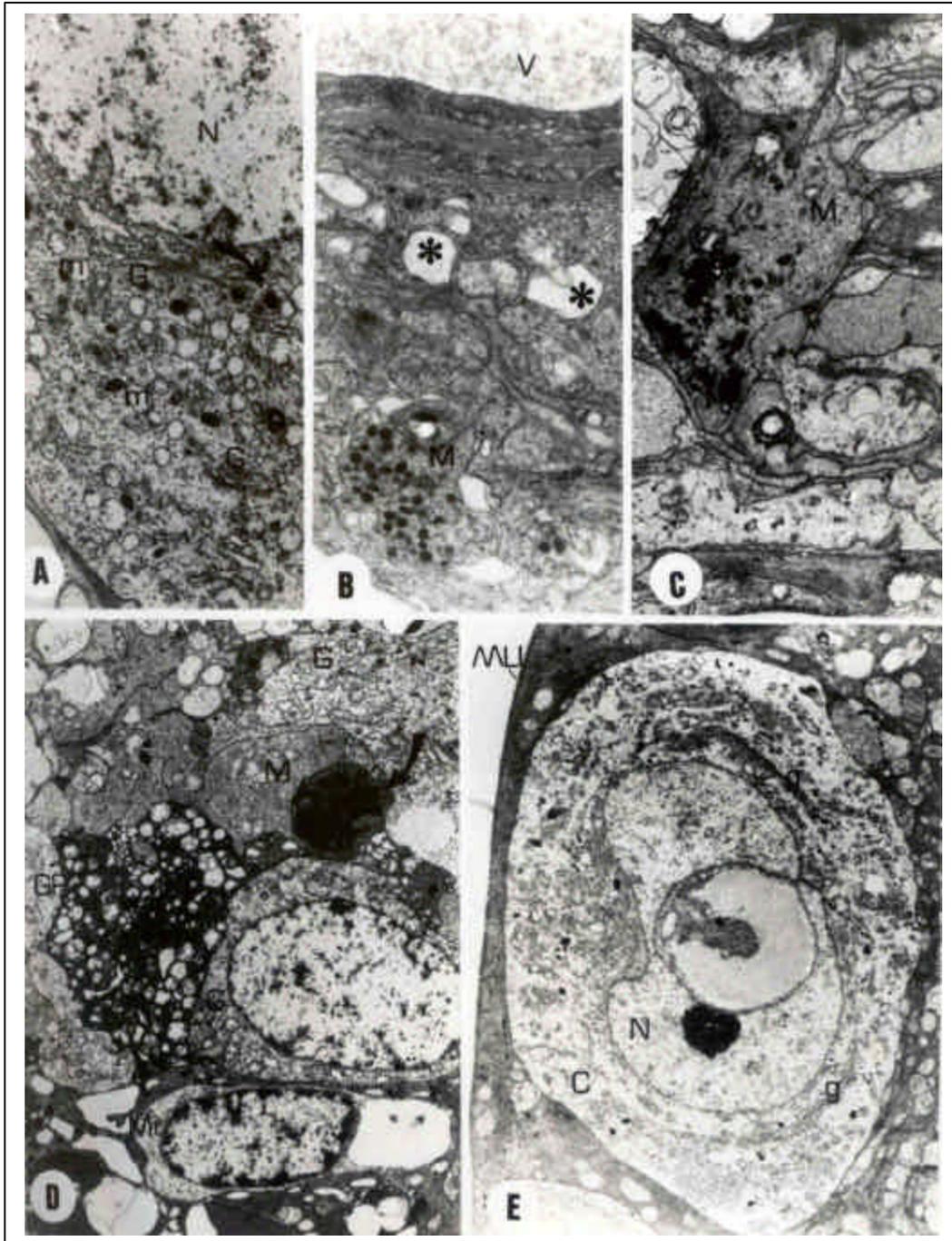
13.b:- Célula ganglionar apresentando núcleo (N) com cromatina frouxa. No citoplasma, exuberância em ribossomos (seta seta), retículo endoplasmático

rugoso (RER), mitocôndrias ovóides (m) e corpos densos (seta curta) (X 10.000 - GC rato 26 - M<sub>3</sub>).

**FIGURA 13 c,d:- CG e camada de fibras nervosas(CFN) de rato diabético (GD).**

13.c:- As células ganglionares apresentam intensa rarefação citoplasmática. Na CFN, presença de debris celulares, "figuras de Mielina", e corpos residuais (seta). Camada plexiforme interna (CPI) (X 2.750 - GD rato 199 - M<sub>5</sub>).

13.d:- Células da glia, algumas bastante eletrondensas (\*). Corpos densos (seta curva). Membrana limitante interna (\*). Vacúolo (v) (X 10.000 - GD rato 23 - M<sub>4</sub>).



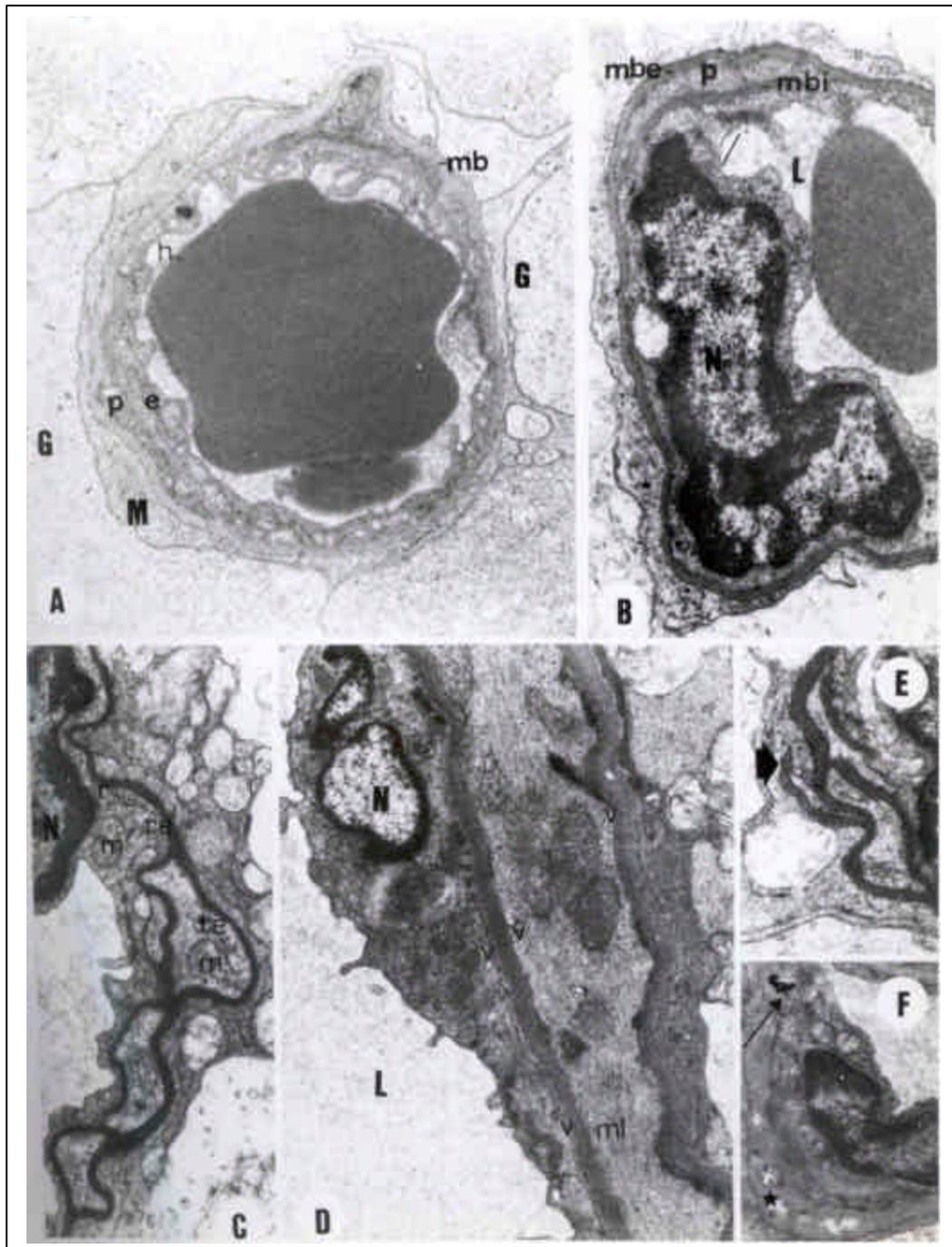
**FIGURA 14 a,b,c:- Camada ganglionar (CG) de rato diabético (GT).**

- 14.a:- Célula ganglionar contendo núcleo (N) com rarefação da cromatina. Mitocôndrias edemaciadas (m), corpos densos (seta curva), Golgi (G) (X 10.000 - GD rato 52 - M<sub>4</sub>).

- 14.b:- Presença de espaços eletrtransparentes (\*) no meio extracelular. Prolongamento citoplasmático de célula de Müller (M) repleto de formações eletrondensas. Vaso (V) (X 10.000 - GD rato 152 - M<sub>5</sub>).
- 14.c:- Prolongamento citoplasmático de célula de Müller(M) contendo inúmeros lisossomos e corpos densos (X 11.400 - GD rato 284-M<sub>5</sub>).

**FIGURA 14 d,e:- Camada ganglionar de rato diabético tratado (GT).**

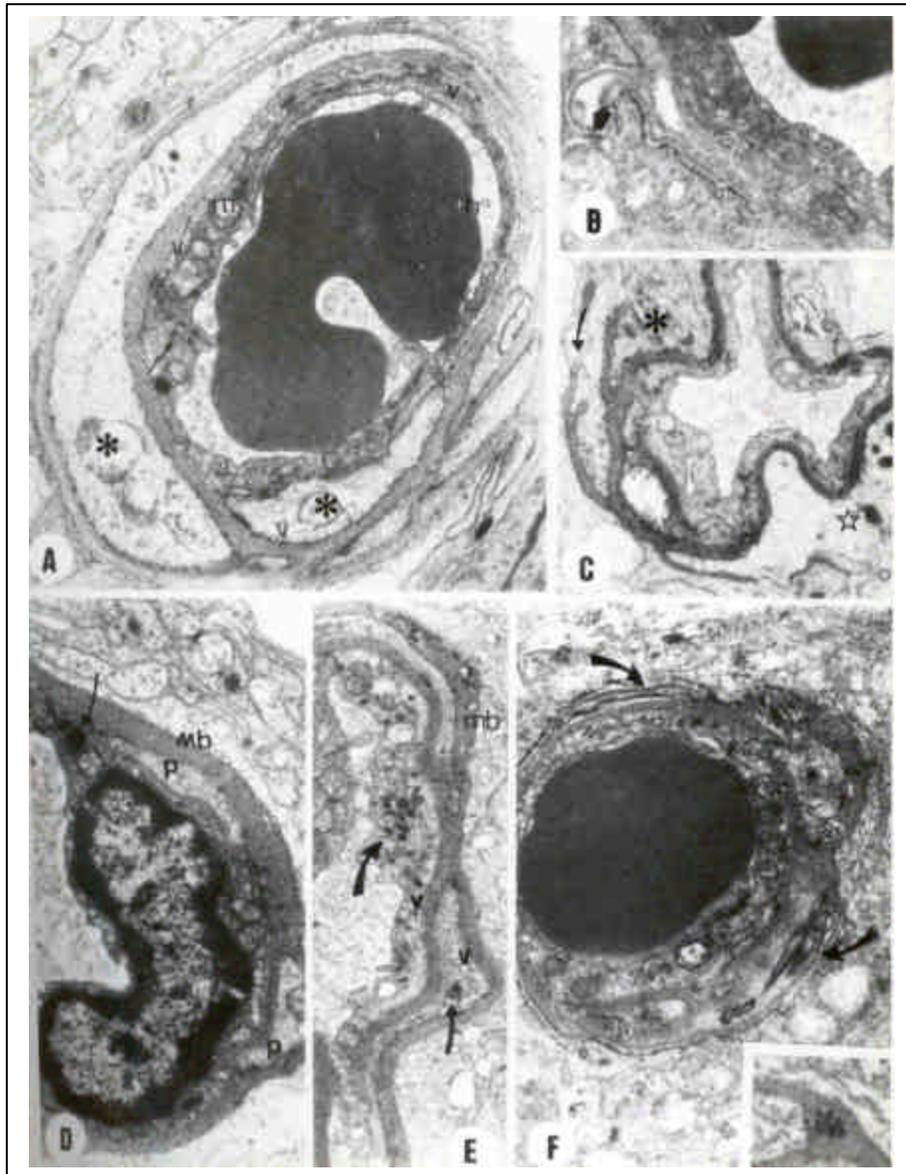
- 14.d:- Células da glia perivascular (GP), microglial (Mi) e ganglionar (G). Observar prolongamento citoplasmático de célula de Müller contendo corpos residuais (seta curva) (X 6.500 - GT rato 97 - M<sub>3</sub>).
- 14.e:- Célula ganglionar com rarefação nuclear (N) e citoplasmática (C). Golgi (G). Membrana limitante interna (MLI) (X 5.000 -GT rato 11 - M<sub>3</sub>).



**FIGURA 15 a,b,c,d,e,f:- Vasos retinianos de rato normal (GC).**

15.a:- Vaso composto por células endoteliais (e), pericitos (p) e envolvidos por membrana basal (mb). Prolongamentos citoplasmáticos de células de Müller (M) ao redor do vaso. Células glias (G). Hemácia (h) (X 21.000- GC rato 90 - M<sub>1</sub>).

- 15.b:- Célula endotelial com núcleo (N) alongado. Junção íntima (seta) entre células endoteliais e projeções em "dedo-de-luva" em direção à luz vascular (L). Pericito (p). Membrana basal interna (mbi) e membrana basal externa (mbe) (X 21.000 - GC rato 13 - M<sub>5</sub>).
- 15.c:- Observar, no citoplasma endotelial e pericítico, mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (re) e ribossomos (r)(X 21.000 - GC rato 15 - M<sub>4</sub>).
- 15.d:- Parede de arteríola retiniana. Célula endotelial com citoplasma rico em ribossomos e poucas vesículas pinocitóticas (v). Núcleo (N). Envoltório de fibra muscular lisa (ml). Lúmen vascular (L) (X 21.000 - GC rato 100 - M<sub>4</sub>).
- 15.e:- Observar projeção de membrana basal (seta) em direção às células vizinhas.
- 15.f:- Presença de espaços eletrtransparentes (\*) dentro da membrana basal, assim como acúmulos osmiofílicos (seta) (X 21.000 - GC rato 11 - M<sub>5</sub>).

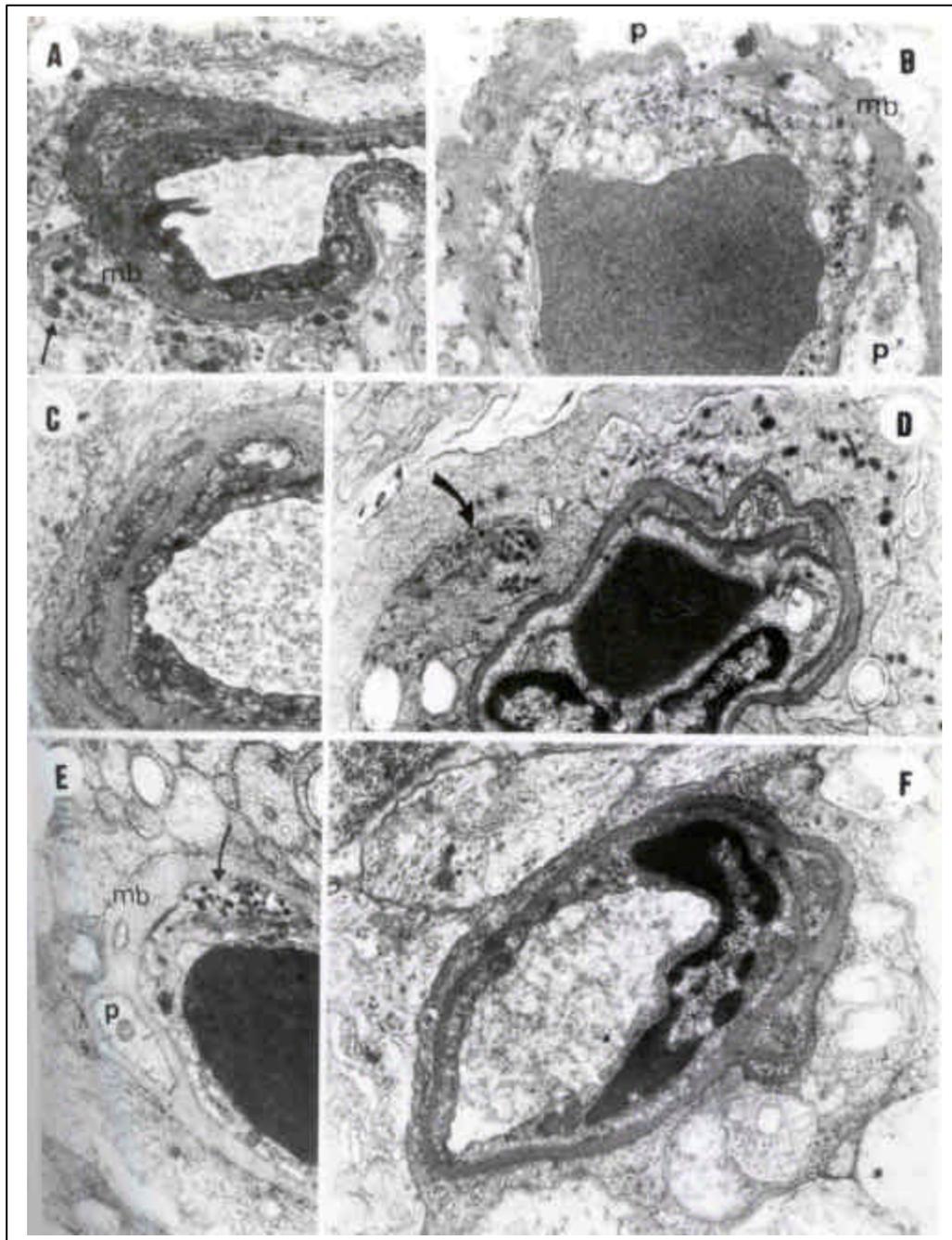


**FIGURA 16 a,b,c,d,e,f,g:- Vasos retinianos de rato diabético (GD).**

16.a:- Capilar retiniano do plexo superficial. Células endoteliais com mitocôndrias edemaciadas (m), corpos densos(seta) e inúmeras vesículas pinocitóticas (v). Pericitos com intensa rarefação citoplasmática, múltiplas vesículas (v) e vacúolos (\*). Hemácia (h) (X 21.000 - GD rato 199 - M<sub>5</sub>).

16.b:- Membrana basal contendo espaços eletrtransparentes (seta) (X 21.000 - GD rato 1 - M<sub>3</sub>).

- 16.c:- Projeções da membrana basal (seta) em direção à células gliais. Observar estruturas eletrondensas (\*) em prolongamento citoplasmático de célula de Müller. Corpos residuais (\*) (X 21.000 - GD rato 23 - M<sub>4</sub>).
- 16.d:- Corpos densos (seta) no citoplasma endotelial. Citoplasma pericítico(p) mais rarefeito que o endotelial. Membrana basal (mb) espessa. (X 21.000 - GD rato 39 - M<sub>5</sub>).
- 16.e:- Observar a grande quantidade de corpos densos (seta espessa) no citoplasma endotelial. Muitas vesículas pinocitóticas (v) em células endoteliais e pericíticas. Grânulos de glicogênio (seta fina). Membrana basal (mb) espessa (X 21.000 - GD rato 53 - M<sub>3</sub>).
- 16.f:- Capilar do plexo profundo mostrando espessamento importante da membrana basal e acúmulos osmiofílicos (seta) (X 21.000 - GD rato 53 - M<sub>3</sub>).
- 16.g:- Detalhe do acúmulo osmiofílico observado dentro da membrana basal (X 36.900 - GD rato 52 - M<sub>4</sub>).



**FIGURA 17 a,b:- Vasos retinianos de rato diabético (GD).**

17.a:- Observar espessamento da membrana basal (mb) e os acúmulos eletrondensos (seta) em células adjacentes (X 21.000 - GD rato 1 - M<sub>3</sub>).

17.b:- Degeneração pericítica (p) e membrana basal (mb) com espessamento não homogêneo (X 21.000 - GD rato 113 - M<sub>2</sub>).

**FIGURA 17 c,d,e,f:- Vasos retinianos de rato diabético tratado(GT).**

17.c:- Observar que as alterações no GT são menos intensas que no GD (X 21.000 - GT rato 13 - M<sub>5</sub>).

17.d:- Acúmulos de corpos residuais (seta) em prolongamentos citoplasmáticos de células adjacentes a vaso com estrutura relativamente preservada (X 21.000 - GT rato 291 - M<sub>5</sub>).

17.e:- Célula endotelial com muitos corpos densos (seta). Pericito (p) com rarefação citoplasmática. Membrana basal(mb) espessa (X 21.000 - GT rato 30 - M<sub>5</sub>).

17.f:- Capilar retiniano do plexo profundo, mostrando poucas alterações (X 21.000 - rato GT - M<sub>4</sub>).

### **3. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS VASOS RETINIANOS**

As tabelas 1 a 8 mostram as médias dos valores e análise estatística, referentes a: área das células endoteliais, dos pericitos, da membrana basal, e do lúmen vascular das camadas ganglionar e plexiforme externa. Tais valores correspondem às medidas feitas nos 3 grupos nos 5 momentos experimentais.

Os valores de cada animal, assim como suas medidas descritivas, encontram-se nas Tabelas 6 a 21 do apêndice.

### 3.1 Área das células endoteliais de vasos da CG

**TABELA 1:-** Média dos valores da área das células endoteliais (um<sup>2</sup>), dos vasos da CG, dos ratos dos diferentes grupos experimentais, nos momentos de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO				
	M1	M2	M3	M4	M5
Controle	63,94a		73,74ab	0,68a	62,36a
	79,17a				
(GC)	A	A	A	A	A
Diabético	61,23a		76,90b	78,15a	60,37a
	80,61a				
(GD)	A	A	A	A	A
Diabético	63,19a		53,80a	63,74a	
	68,14a	68,30a			
Tratado(GT)	A	A	A	A	A

CV = 17,83%

DMS (5%) = 20,50 para grupo dentro de momento

DMS (5%) = 23,99 para momento dentro de grupo

A comparação entre os grupos, quanto a média da área de células endoteliais dos vasos da CG, não mostrou diferença significativa, com exceção de GT menor que GD em M<sub>2</sub>. Também não houve diferença significativa, dessa variável, nos diferentes momentos, em nenhum dos grupos (Tabela 1).

### 3.2 Área de células endoteliais de vasos da CPE

**TABELA 2:-** Média dos valores da área das células endoteliais ( $\mu\text{m}^2$ ), dos vasos da CPE dos ratos dos diferentes grupos experimentais, nos momentos de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO				
	M1	M2	M3	M4	M5
Controle 58,72a (GC)	67,41a A	68,11a A	61,73a A	65,82a A	A
Diabético 65,23a (GD)	67,68a A	73,53a A	80,56a A	73,45a A	A
Diabético 68,59a Tratado(GT)	58,52a A	68,28a A	60,86a A	67,20a A	A

CV = 22,95%

DMS (5%) = 26,15 para grupo dentro de momento

DMS (5%) = 30,62 para momento dentro de grupo

Os vasos da CPE não apresentaram diferença estatisticamente significativa da média dos valores da área das células endoteliais entre os grupos nos

diferentes momentos, embora os valores obtidos para o GD tenham sido superiores aos do GC em todos os momentos experimentais. Também não houve diferença significativa entre os momentos, dentro de cada grupo (Tabela 2).

### 3.3 Área dos pericitos de vasos da CG

**TABELA 3:-** Média dos valores da área dos pericitos ( $\text{um}^2$ ) dos vasos da CG dos ratos dos diferentes grupos experimentais, nos momentos de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO				
	M1	M2	M3	M4	M5
Controle (GC)	23,65a 24,12a A		22,98b A	21,47a A	14,03a A
Diabético (GD)	17,31a 21,96a A		24,22b A	2,12a A	21,97a A
Diabético Tratado(GT)	18,31a 22,46a AB		9,43a A	12,06a AB	16,72a B

CV = 33,31%

DMS (5%) = 11,05 para grupo dentro de momento

DMS (5%) = 12,94 para momento dentro de grupo

Nos vasos da CG, a média dos valores da área pericítica nos diferentes grupos mostrou diferença significativa em M2, quando o valor desta variável foi menor no GT. A análise dos momentos dentro de cada grupo, também foi significativa apenas no GT, onde a média de M5 foi maior que a de M2. (Tabela 3).

### 3.4 Área dos pericitos de vasos da CPE

**TABELA 4:-** Média dos valores da área dos pericitos (um<sup>2</sup>) dos vasos da CPE dos ratos dos diferentes grupos experimentais, nos momentos de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO				
	M1	M2	M3	M4	M5
Controle	14,36a	15,20a		17,28a	
12,30a	15,42a				
(GC)	A	A	A	A	A
Diabético	14,21a	12,71a		15,04a	
22,63a	19,46a				
(GD)	A	A	A	A	A
Diabético	19,88a	10,16a		12,08a	
20,18a	18,93a				
Tratado(GT)	A	A	A	A	A

CV = 39,45%

DMS (5%) = 10,72 para grupo dentro de momento

DMS (5%) = 12,55 para momento dentro de grupo

Em vasos da CPE, não houve diferença significativa entre as médias dos valores da área pericítica, nem entre os grupos dentro de cada momento, nem entre os momentos dentro de cada grupo (Tabelas 9).

### 3.5 Área da membrana basal externa de vasos da CG

**TABELA 5:-** Média dos valores da área da membrana basal externa (um<sup>2</sup>) dos vasos da CG dos ratos dos diferentes grupos experimentais, nos momentos de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO				
	M1	M2	M3	M4	M5
Controle	32,32a	42,55a	45,64a		
	38,82a	41,80a			
(GC)	A	A	A	A	A
Diabético	41,60a	41,54a	52,27a		
	50,80a	51,87a			
(GD)	A	A	A	A	A
Diabético	38,54a	33,61a	41,95a		
	50,14a	45,07a			
Tratado(GT)	A	A	A	A	A

---

CV = 19,88%

DMS (5%) = 14,61 para grupo dentro de momento

DMS (5%) = 17,11 para momento dentro de grupo

Com relação a média dos valores da área da MBE dos vasos da CG, a análise estatística não detectou diferença significativa, seja entre os grupos dentro de cada momento, ou seja entre os momentos dentro de cada grupo. Embora, não haja diferença estatística, pode-se observar tendência a valores maiores de área nos animais do GD, assim como, progressão nos seus valores médios de M<sub>1</sub> para M<sub>5</sub> em todos os grupos experimentais (Tabela 5).

### 3.6 Área da membrana basal externa de vasos da CPE

**TABELA 6:-** Média dos valores da área da membrana basal externa (um<sup>2</sup>) dos vasos da CPE dos ratos dos diferentes grupos experimentais, nos momentos de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO				
	M1	M2	M3	M4	M5
Controle 33,86a (GC)	33,26a		30,85ab	38,99ab	29,11a
Diabético 47,78b (GD)	33,97a		38,91b	45,79b	39,78b
Diabético 33,38ab Tratado(GT)	31,54a		26,49a	34,28a	
	42,22ab				
	AB	A	AB	AB	B

CV = 17,44%

DMS (5%) = 10,67 para grupo dentro de momento

DMS (5%) = 12,50 para momento dentro de grupo

A média dos valores da área da MBE em vasos da CPE foi significativamente maior no GD em relação ao GC, nos momentos M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub>, e também em relação ao GT, nos momentos M<sub>2</sub> e M<sub>3</sub>. Não houve diferença significativa entre o GC e o GT.

Com relação ao efeito do momento, houve aumento significativo da média dos valores de área da MBE em M<sub>5</sub>, nos grupos GD e GT (Tabela 6).

### 3.7 Área do lúmen de vasos da CG

**TABELA 7:-** Média dos valores da área do lúmen (um<sup>2</sup>) dos vasos da CG dos ratos dos diferentes grupos experimentais, nos momentos de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO				
	M1	M2	M3	M4	M5
Controle 169,35a (GC)	39,62a A	144,46a A	162,73a A	138,99a A	
Diabético (GD)	128,26a A	134,62a A	137,69a A	122,38a A	185,15a A
Diabético 160,31a Tratado(GT)	99,09a A	127,04a A	133,28a A	141,08a A	

CV = 26,90%

DMS (5%) = 64,75 para grupo dentro de momento

DMS (5%) = 75,80 para momento dentro de grupo

Não houve diferença significativa nem entre grupos dentro de cada momento, nem entre momentos dentro de cada grupo, porém há notória tendência de aumento da média dos valores da área de M<sub>1</sub> para M<sub>5</sub>, em todos os grupos (Tabela 7).

### 3.8 Área do lúmen de vasos da CPE

**TABELA 8:-** Média dos valores da área do lúmen (um<sup>2</sup>) dos vasos da CPE dos ratos dos diferentes grupos experimentais, nos momentos de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO				
	M1	M2	M3	M4	M5
Controle (GC)	145,39a A	128,20a A	128,99a A	113,38a A	136,02a A
Diabético (GD)	131,97a A	144,44a A	111,75a A	118,24a A	177,82a A
Diabético Tratado(GT)	112,05a A	107,96a A	109,91a A	130,70a A	126,16a A

CV = 29,83%

DMS (5%) = 65,01 para grupo dentro de momento

DMS (5%) = 76,10 para momento dentro de grupo

No tocante à média dos valores da área do lúmen de vasos da CPE, a análise estatística não mostrou diferença significativa tanto entre os grupos dentro de cada momento, como entre os momentos dentro de cada grupo (Tabela 8).

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 QUANTO À METODOLOGIA

#### 4.1.1. MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO

Há vários animais que podem servir de modelo experimental para o estudo do diabetes. No presente trabalho empregou-se o rato, em razão das seguintes vantagens apresentadas por esse animal: a) fácil manuseio (alimentação, higiene, acomodação); b) possibilidade de trabalho simultâneo com vários grupos experimentais, sem ocupar grandes espaços; c) curta duração do seu ciclo biológico, o que permite se obter alterações crônicas e degenerativas em pouco tempo, ao passo que se levaria muitos anos empregando-se animais de alta longevidade.

As espécies que apresentam diabetes espontaneamente, em geral, vivem em colônias, e não estão disponíveis em nosso meio.

Dentre as várias formas de indução do diabetes experimental (MORDES & ROSSINI, 1981, 1985; BELL & HYE, 1983), o uso de agentes betacitotóxicos é uma das mais utilizadas, sendo a Aloxana e a Estreptozotocina as drogas mais empregadas e estudadas. Essas drogas permanecem poucos minutos na circulação sanguínea e destroem, seletivamente, as células beta do pâncreas, causando insuficiência insulínica permanente (LUKENS, 1948; JUNOD et al., 1967; MORDES & ROSSINI, 1985).

Neste estudo foi utilizada a Aloxana, que é um derivado do ácido úrico. DUNN et al. (1943), enquanto estudavam as lesões renais produzidas pelo ácido úrico e seus derivados, descobriram acidentalmente que a Aloxana destrói as células beta do pâncreas, provocando diabetes de longa duração em muitas espécies de animais.

A Aloxana 2%, administrada por via endovenosa e na dose de 42 mg/kg de peso, produziu diabetes acentuado nos animais aqui pesquisados levando a alterações clínicas e laboratoriais bem definidas.

Porém, a margem entre a dose diabetogênica e a dose letal é estreita (JUNOD et al., 1969; ROSSINI et al., 1977). No início deste estudo, ainda na fase de padronização, utilizou-se Aloxana por via endovenosa, na dose de 50 mg/kg de peso, em animais em jejum de 14 horas. Com tal procedimento, 75% dos animais tornavam-se diabéticos e, em 30 dias de evolução, a mortalidade era de 100%. Em vista disso e com base na literatura que apontava doses de Aloxana de 40-45 mg/kg de peso como diabetogênicas (LAZAROW et al., 1946; LUKENS, 1948; BELL & HYE, 1983; GARRIS et al., 1984), optou-se pela redução da dose para 42 mg/kg. LUKENS (1948), em extensa revisão da literatura a respeito dos efeitos da Aloxana sobre animais de várias espécies, observou índices muito variáveis de mortalidade, oscilando entre 33 e 100%. Esses índices estão ligados a múltiplos fatores que são capazes de mudar os efeitos da Aloxana e a sensibilidade do hospedeiro, envolvendo o estado de hidratação da droga, a velocidade de infusão, a via de administração, a dieta, o tempo de jejum, o peso do animal e, até, a utilização de substâncias capazes de influenciar seus mecanismos de ação, tais como barbitúricos, ácido nicotínico, etc. Os ratos, por exemplo, são mais sensíveis à Aloxana se alimentados, previamente, com dieta contendo alto teor de gorduras. A taxa de mortalidade, nesses casos, alcança de 90 a 100% dos animais. Dietas pobres em gordura e com altas concentrações de proteínas e carboidratos, diminuem esses índices.

Ainda na fase de padronização, foi observado que alguns ratos que tinham recebido a Aloxana não se tornaram diabéticos e que a intensidade do diabetes foi diferente em cada animal. Com a mesma metodologia, SPADELLA (1989) observou que 41,2% dos ratos desenvolvem diabetes grave e 20% não desenvolvem a doença.

Os mesmos fatores que influem nos índices de mortalidade, influenciam o desenvolvimento ou não do diabetes. Se a Aloxana for administrada ao

animal após jejum prolongado, cerca de 95% desses animais, tornar-se-ão diabéticos. Se a mesma dose for administrada, porém não se mantendo o jejum, a resposta diminui para 25%.

LUKENS (1948) cita que a toxicidade da Aloxana se altera em relação linear com o peso do animal, aumentando de 0,73 poderes de toxicidade para cada unidade de peso. Cita ainda, o mesmo autor, que animais que não respondem a uma primeira dose de Aloxana podem ser refratários a injeções posteriores, de doses similares.

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

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

#### **4.1.2 ADMINISTRAÇÃO DOS TRATAMENTOS PROPOSTOS**

A acarbose fez parte da dieta dos animais e foi bem aceita. Ela é um pseudotetrassacarídeo de origem microbiana que inibe a atividade das hidrolases glicosídicas (amilase, sucrase, maltase) do intestino delgado, reduzindo e retardando a absorção e a digestão de carboidratos complexos da dieta (JENKINS et al., 1979;

HILLEBRAND et al., 1979). A acarbose é útil, para o tratamento de diabéticos insulino-dependentes, como terapêutica auxiliar (DAMOISEAUX et al., 1983).

A insulina utilizada foi a porcina monocomponente de ação prolongada que permitiu o controle dos níveis glicêmicos dos ratos, por período de até 16 horas.

A administração da insulina por via subcutânea foi de fácil execução, do ponto de vista técnico. Contudo, as doses administradas diariamente exigiram avaliação clínica cuidadosa do animal, além do controle da ingestão hídrica, da diurese, do peso, assim como pesquisa de glicose e corpos cetônicos na urina e dosagens de glicose sanguínea e urinária. Todos esses dados foram levados em conta para o cálculo de cada dose a ser administrada.

O tipo ideal de insulina a ser utilizado, os fatores a serem levados em conta para os cálculos das doses diárias e o melhor horário para a administração da droga foram padronizados em "experiências-piloto". A associação de insulina com a acarbose foi feita devido ao fato de que, o tratamento feito apenas com insulina, levava à melhora discreta dos parâmetros clínico-laboratoriais.

A comparação entre os índices de mortalidade dos animais do GD e do GT mostrou que, para ambos, a mortalidade foi grande nos 3 primeiros meses de doença (59,37% para GD e 67,3% para GT - BREIM, 1990). O fato de o GT apresentar os maiores índices de mortalidade está provavelmente associado à hipoglicemia induzida pelo tratamento. Porém, vencida a fase de descompensação metabólica inicial, os animais do GT tiveram sobrevida maior que os do GD. A escolha de animais portadores de diabetes grave pode ter contribuído para a alta taxa de mortalidade observada.

## 4.2 QUANTO AOS PARÂMETROS MORFOLÓGICOS

### 4.2.1 AVALIAÇÃO DAS CAMADAS RETINIANAS

A avaliação das camadas retinianas do rato nos mostrou que a retina do rato é muito semelhante ao descrito para o ser humano.

O epitélio pigmentar (EP) retiniano atua como uma barreira permeável entre os vasos da coriocapilar e a retina (GRIMES & LATIES, 1980), possuindo funções de absorção, secreção, excreção e transporte.

CANO et al. (1986) observaram EP irregular em forma e espessura e aumento de de corpos densos e lipídeos em ratos normais e idosos.

Os animais do GD apresentaram, ao exame ultraestrutural, diminuição da altura e do número das invaginações, principalmente no M<sub>4</sub> e no M<sub>5</sub>. GRIMES & LATIES (1980), examinando o EP de ratos diabéticos por Estreptozotocina, após 3 a 5 semanas, observaram proliferação focal e progressiva das invaginações basais, sugerindo que o aumento de permeabilidade que ocorre no diabetes está relacionado com aumento da superfície basal do EP. Em estudo posterior, GRIMES et al. (1984) interrogaram se esse aumento das pregas basais poderia decorrer de efeito tóxico da Estreptozotocina. Criaram, então, 2 grupos experimentais, um de ratos diabéticos por Estreptozotocina com reversão imediata do diabetes por transplante pancreático, e o outro, composto por ratos diabéticos por Aloxana. Apenas os ratos aloxânicos apresentaram proliferação focal de pregas basais, mostrando ser essa alteração decorrente do estado diabético. Os mesmos autores encontraram, entre 90 células do EP examinadas, proliferação de membrana plasmática em apenas 16 delas. Talvez o aumento das pregas basais, não tenha sido observado por ser este pouco freqüente.

GRIMES et al. (1984) observaram ainda, que animais com 6 meses de diabetes apresentavam menor quantidade de proliferação basal que os de 1 mês. BLAIR et al. (1984), examinando ratos BB Wistar, portadores de diabetes espontâneo, encontraram aumento focal das pregas basais no início do diabetes, com possíveis pregas aumentadas inclusive nas faces laterais das células. Mas depois de 4 meses de doença, notaram tendência à diminuição total das pregas basais. VINOES et al. (1988) observaram "dilatação de pregas basais" em ratos com mais de 7 meses de diabetes.

Portanto, animais portadores de diabetes de longa evolução, como nossos animais do M<sub>4</sub> e do M<sub>5</sub>, podem apresentar diminuição da superfície da membrana plasmática da base do EP retiniano, o que faz supor-se trocas prejudicadas entre a coriocapilar e o EP nesses animais.

Nas faces laterais apicais das células do EP retiniano há junções selantes, que exercem importante função na barreira hemato-ocular. Não foi incluído neste estudo, o uso de traçadores, que poderiam evidenciar alterações nessas junções. Alguns comentários a respeito, no entanto, serão tecidos. KRUPIN et al. (1979), utilizando injeção intravenosa de fluoresceína, em ratos diabéticos há 2 meses e que não apresentavam alterações ultraestruturais do EP, observaram aumento da fluorescência vítrea, sugerindo que a quebra da barreira hemato-ocular é a mais precoce alteração diabética, antecedendo as alterações ultraestruturais. WALTMAN et al. (1978) observaram que a alteração da barreira ocorre 15 dias após a indução diabética, embora as alterações histológicas estejam presentes somente após 2 meses (KOJIMA et al., 1972). O aumento da osmolaridade parece ser responsável pela quebra da barreira hemato-ocular (TSO et al., 1980), e a estabilização metabólica pode levar à sua normalização (KERNELL & ARNQVIST, 1983).

Alguns detalhes das organelas citoplasmáticas do EP chamaram a atenção. Um deles foi a localização preferencial das mitocôndrias próximo às invaginações basais e à superfície lateral das células, provavelmente locais de maior

atividade ATPásica. Outro, foi a exuberância do REL, que ocupa grande parte do citoplasma. Não foi realizado exame morfométrico nessas organelas e, à simples inspeção, não foram constatados o edema mitocondrial e a dilatação do REL que, segundo alguns autores, ocorre em células do EP de ratos diabéticos (TSO et al., 1980; BLAIR et al., 1984). CALDWELL & SLAPNICK (1989) não observaram alterações em mitocôndrias de ratos diabéticos, apesar de nelas terem constatado aumento da atividade citocromo-oxidase.

Nos animais normais foram observados, em localização apical, grânulos pigmentares, corpos densos, lisossomos e gotículas lipídicas, mais numerosos em animais do M<sub>5</sub>. Porém, nos animais do GD, geralmente em M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub>, foi encontrada quantidade maior dessas estruturas, ocorrendo a perda da distribuição preferencial apical, o que também já foi observado em ratos portadores de diabetes espontâneo (VINOIRES et al., 1988). O aumento dos corpos densos e lisossomos é um sinal indireto de degeneração acelerada de organelas citoplasmáticas ou de fotorreceptores, já que aquelas organelas estão relacionadas à fagocitose e à remoção dos detritos celulares. O aumento de gotas lipídicas poderia indicar alteração do metabolismo celular do EP. Segundo MacGREGOR & MATSCHINSKY (1986), o metabolismo do EP é marcadamente alterado no diabetes, sendo que o aumento da glicose intracelular acentua a utilização do ciclo do polyol, levando ao acúmulo de sorbitol e frutose. O aumento do sorbitol, aliado à hiperglicemia, promove diminuição da função celular, ficando prejudicados os processos de divisão celular, a síntese de ácidos nucleicos, a função da Na-K-ATPase e a captação de aminoácidos.

Nos ratos utilizados não foram encontradas algumas alterações no EP do GD relatadas por outros autores, como a necrose focal de células do EP (TSO et al., 1980; BLAIR et al., 1984), discos de fotorreceptores em aposição direta à membrana de Bruch e a presença de células macrofágicas sub-retinianas (TSO et al., 1980).

Os animais do GT apresentaram EP semelhante ao de ratos normais, exceto pelo encontro de 2 vasos em um dos animais em M<sub>5</sub>. Sabendo-se que o EP não possui vasos, foi surpreendente o encontro destes. Procurou-se averiguar outros relatos sobre a existência de vasos no EP. CANO et al. (1986) os encontraram em ratos normais de 29 a 31 meses. Em ratos portadores de retinopatia por uretana e fototoxicidade, KORTE et al. (1986) também observaram o aparecimento de vasos e aumento de interdigitações dentro do citoplasma de células do EP. Portanto, a presença de vasos no EP talvez esteja relacionada a condições degenerativas e hipóxicas.

A análise de alterações encontradas na camada de cones e bastonetes (CB) deve ser feita com reservas, uma vez que não fez parte deste estudo a padronização da intensidade luminosa da sala de manutenção e de sacrifício dos animais, embora tenham sido todos os ratos submetidos às mesmas condições experimentais.

Os segmentos externo e interno dos CB de ratos do GD estiveram mais espaçados entre si em M<sub>5</sub>, o que leva a supor-se uma diminuição no número de CB em ratos diabéticos de 12 e 1/2 meses. Essa observação pode ser outro indício de que a involução senil é mais precoce em diabéticos, já que CANO et al. (1986) observaram diminuição de CB em ratos normais de 29 a 31 meses. A destruição de fotorreceptores pode também decorrer de toxicidade química ou de fototoxicidade (KORTE et al., 1986) ou ser provocada com dietas ricas em sucrose (YANKO et al., 1972).

O aumento de corpos densos e lisossomos foi frequente nos CB dos animais do GD, mostrando que a degeneração das organelas também ocorre no primeiro neurônio da via óptica. As alterações observadas na morfologia mitocondrial (o edema e a diminuição de suas cristas) sugerem falência da bateria produtora de energia celular. Os vacúolos opticamente vazios, contendo "figuras de Mielina", exprimem necrose de estruturas citoplasmáticas.

A presença de glicogênio livre em fotorreceptores já havia sido salientada por outros (KUWABARA & COGAN, 1961; HOGAN et al., 1971). No

entanto, não foi encontrada qualquer referência aos "cistos glicogênicos" observados em todos os grupos, mesmo à microscopia óptica, com conteúdo glicogênico confirmado pela coloração de PAS. Seriam esses "cistos" específicos de ratos? Qual seria o motivo para que ratos do GC em M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub> tivessem maior número de "cistos"? Estariam eles relacionados com degeneração senil? Os ratos do GD os apresentaram em maior quantidade, podendo isto significar sua associação com transtornos do metabolismo celular que melhorariam com o tratamento, uma vez que os animais do GT os tiveram em quantidade semelhante aos do GC.

A membrana limitante externa (MLE) formada, na realidade, por uniões intercelulares, foi semelhante nos animais do GC, do GD e do GT, em todos os momentos experimentais.

A camada nuclear externa (CNE) possui prolongamentos citoplasmáticos, corpo celular e axônio dos CB, assim como prolongamentos citoplasmáticos de células de Müller. A condensação central da cromatina dos núcleos dos CB é uma característica desse tipo celular no ser humano e em animais (POULIQUEN, 1969; HOGAN et al., 1971; LAI, 1980).

Os ratos do GD apresentaram os núcleos dos CB com cromatina menos condensada, com perda da distribuição central preferencial. A descondensação da cromatina ocorre quando as baterias celulares de síntese protéica estão ativadas (DE ROBERTIS & DE ROBERTIS, 1985).

Os agregados de cromatina que foram observados próximo à carioteca em núcleos dos CB do GD podem ser interpretados como nucléolos, significando novamente síntese aumentada (DE ROBERTIS & DE ROBERTIS, 1985) ou sinal de sofrimento e morte celular (BARRON et al., 1986). Outro sinal de morte celular observado nos CB de ratos do GD foi a presença de núcleos picnóticos.

Os animais do GD apresentaram citoplasma menos denso em torno dos núcleos, talvez resultado de edema citoplasmático. Além disso, exibiram células

responsáveis pela digestão de restos necróticos (corpos densos e lisossomos) e "cistos glicogênicos".

No GT foram observados núcleos heterogêneos, ora com a cromatina condensada centralmente, ora descondensada. No restante, a CNE foi semelhante ao GC.

Na camada plexiforme externa (CPE), foi verificado que os axônios de CB fazem sinapse com prolongamentos citoplasmáticos de células bipolares, horizontais e de Müller.

Nos animais do GC em M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub> foram observados vacúolos digestivos e corpos residuais, provavelmente fazendo parte do processo de involução senil. Porém, os animais do GD apresentaram essas alterações mais precocemente.

No GD observou-se acúmulo de glicogênio (também observado por BABEL, 1982), lisossomos e corpos densos em axônios e prolongamentos citoplasmáticos, principalmente nos localizados na região perivascular, o que pode indicar ser essa região a mais acometida pelos transtornos metabólicos.

A diminuição do número de vesículas sinápticas e mesmo a total substituição da sinapse por detritos celulares mostra que a transmissão sináptica é prejudicada no GD.

Os ratos do GT apresentaram CPE com algumas das alterações observadas no GD, porém em menor intensidade.

Na camada nuclear interna (CNI) foram encontrados núcleos de neurônios de associação - as células horizontais próximas à CPE, e as células amácrinas próximas à CPI. Os núcleos do segundo neurônio da via óptica, ou seja, das células bipolares, situam-se mais internamente, ao lado dos núcleos de células de Müller. As células de Müller fazem parte da glia retiniana.

Por entre os núcleos foram encontrados os prolongamentos citoplasmáticos de células horizontais, bipolares, amácrinas e de Müller, assim como os axônios das células bipolares.

Nos animais do GC em M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub> foram observados alguns corpos densos, lisossomos e debris celulares no citoplasma de todos os tipos celulares.

Examinando as células da CNI dos ratos do GD, constatou-se descondensação da cromatina e os mesmos agregados cromáticos excêntricos observados nos núcleos dos CB. No citoplasma, novamente o aumento dos corpos residuais e glicogênio livre. Portanto, também na CNI observaram-se sinais de sofrimento, morte e tentativa de regeneração celular por meio do aumento de síntese.

Nos animais do GD, dentre todas as células retinianas, foram as células de Müller as que mais alterações apresentaram. Além das alterações nucleares semelhantes às das demais células retinianas, observou-se, no citoplasma, grande quantidade de lisossomos e corpos residuais ocupando-o, às vezes, por completo. As células de Müller dão suporte estrutural para as células condutoras e nutrição para as células neurais (PENFIELD, 1932; HOGAN & FEENEY, 1963b). São consideradas fonte primária de glicogênio para os neurônios retinianos (KUWABARA & COGAN, 1960) podendo sintetizar, estocar e fornecer glicose para as células nervosas (HORI et al., 1980). O exame de todas as camadas retinianas dos animais do GD mostrou acúmulo de glicogênio, o que pode decorrer da excessiva oxidação de ácidos gordurosos (BEAUMONT et al., 1971). É fácil entender-se que a célula que estoca e fornece o glicogênio deva estar alterada frente às evidentes perturbações do metabolismo no diabetes.

Os núcleos celulares, no GD, apresentaram cromatina descondensada, como já foi aqui referido, o que é um sinal de que a síntese protéica está aumentada. As células de Müller atuam também na síntese protéica, sendo nelas

encontrado REL com grau de desenvolvimento não visto em qualquer outro tecido ocular, exceto o EP (HOGAN et al., 1971).

As células de Müller estão dispostas de modo a envolver a maior parte da parede capilar em todas as camadas retinianas (HOGAN & FEENEY, 1963b). Pelas observações feitas neste trabalho, a região perivascular pode ser apontada como portadora do maior número de alterações, ficando, então, as referidas células como alvo fácil dos transtornos metabólicos. Segundo MUKAI (1971), as células de Müller se alteram secundariamente às alterações vasculares.

Outro aspecto a se considerar com relação às células de Müller, é o papel que elas desempenham no sistema de fagocitose da retina interna, possuindo a capacidade de digerir e eliminar corpos residuais e substâncias tóxicas (HORI et al., 1980). Nos animais diabéticos há sinais de necrose celular e há necessidade de remoção e digestão dos restos celulares, o que explica o grande número de lisossomos e corpos residuais nelas encontrados. Segundo HORI et al. (1980), as células de Müller produzem mais enzimas lisossômicas sob condições diabéticas. O aumento da atividade lisossômica está diretamente relacionado com a hiperglicemia (McMILLAN, 1975), visando a remoção dos restos necróticos e a quebra do glicogênio que se acumula em excesso nas células de Müller (HORI et al., 1980).

A necrose das células de Müller leva a prejuízo na nutrição dos neurônios e a perda de sua função de "esqueleto retiniano" (FINE & ZIMMERMANN, 1962; HOGAN & FEENEY, 1963b). A perda da célula de Müller que envolve o capilar, associada ao aumento da pressão arterial, poderá levar ao desenvolvimento dos microaneurismas (HORI & MUKAI, 1980).

Os animais do GT apresentaram, na CNI, as mesmas características que os do GC, porém com quantidade maior de corpos residuais e lisossomos.

A camada plexiforme interna possui axônios de células bipolares que aí farão sinapse com prolongamentos citoplasmáticos de células ganglionares.

Possui ainda, prolongamentos citoplasmáticos de células amácrinas e de células da glia retiniana. Nos animais do GD as alterações foram semelhantes às observadas na CPE, sendo fácil diferenciar-se um animal do GC de um do GD por este último apresentar várias organelas eletrondensas, como lisossomos, corpos residuais e glicogênio no citoplasma celular. A rarefação citoplasmática mostra que no GD ocorre edema citoplasmático e desaparecimento de organelas, levando à suposição de alterações no desempenho das sinápses. Alguns prolongamentos citoplasmáticos, principalmente perivasculares, perderam totalmente suas organelas normais, que foram substituídas por corpos arredondados de diversos padrões de eletrondensidade, os quais poderiam ser interpretados como detritos em vários estágios de degradação.

Os espaços eletrontransparentes existentes entre prolongamentos citoplasmáticos em M<sub>5</sub> podem ser interpretados como coleções de exsudatos, uma vez que se apresentaram, preferencialmente, próximo aos vasos.

Portanto, na CPI do GD observaram-se os mesmos tipos de alterações encontradas nas demais camadas retinianas, acrescentando-se a presença dos espaços eletrontransparentes no meio extracelular. Também na CPI, os animais do GT apresentaram menos alterações que os do GD.

Na camada ganglionar (CG) foram encontradas células ganglionares, microgliais e da glia perivascular, assim como prolongamentos citoplasmáticos de células de Müller.

As alterações ultraestruturais observadas nessa camada em animais do GD foram semelhantes às das demais camadas, acrescentando-se a rarefação citoplasmática em células ganglionares na sua face voltada para a MLI. Também foram observados os espaços eletrontransparentes no meio extracelular. Os animais do GT novamente apresentaram alterações menos intensas que os do GD.

Na camada de fibras nervosas (CFN) de animais do GD observaram-se os mesmos aspectos descritos nas demais camadas, inclusive a maior

eletrondensidade dada pelo acúmulo de determinadas organelas. Os espaços intercelulares também foram nela observados e, mais uma vez, os animais do GT apresentaram menos alterações que os do GD.

A membrana limitante interna (MLI) não diferiu nos diversos grupos em todos os momentos experimentais, embora existam relatos de espessamentos nodulares na MLI de ratos diabéticos relacionados ao espessamento da membrana plasmática de células de Müller (FISCHER & GÄRTNER, 1982). NAGATA & ROBSON (1987) e ROBSON et al. (1989) encontraram aumento da espessura da MLI induzido por galactose e prevenido por inibidores da aldose reductase.

Finalizando os comentários, é importante ressaltar-se que, em todas as camadas retinianas, o exame morfológico mostrou que no rato diabético há aceleração do processo de necrose celular e de involução senil, assim como ativação dos mecanismos de remoção de detritos celulares. As alterações mais evidentes encontram-se nas células de Müller e na região perivascular, mostrando relação com o tempo de evolução da doença. O tratamento instituído (GT) foi capaz de diminuir a intensidade das lesões diabéticas.

#### **4.2.2 VASCULATURA RETÍNICA**

Os vasos retinianos de ratos, conforme observado, possuem características estruturais e ultraestruturais similares aos vasos retinianos humanos e de outros mamíferos (HOGAN & FEENEY, 1963a).

A irrigação das camadas mais internas da retina é feita por ramos da artéria central da retina que possui ramificações a partir do nervo óptico. As arteríolas do rato são encontradas apenas próximo ao nervo óptico, possuindo escasso envoltório de fibras musculares lisas, melhor evidenciado à microscopia óptica pela coloração de

orceína. Os vasos retinianos de ratos formam dois plexos (superficial e profundo) que se comunicam por rica rede anastomótica.

O exame ultraestrutural mostrou que todos os capilares são do tipo contínuo, com células endoteliais unidas através de junções íntimas, configurando os capilares retinianos como parte da barreira hemato-ocular (HOGAN & FEENEY, 1963a; DUKE-ELDER, 1967).

As projeções em direção à luz, no local de união de células endoteliais, e também as não associadas a uniões, foram observadas anteriormente por HOGAN & FEENEY (1963a).

Não foram encontradas alterações morfológicas nas uniões entre células endoteliais nos ratos diabéticos, embora WALLOW & ENGERMAN (1977) tenham relatado haver alargamento das uniões intercelulares no diabetes. TRAP-JENSEN (1970) sugere que o edema endotelial distorce as junções íntimas, ocorrendo aumento de permeabilidade vascular, porém BABEL (1982) e GRIMES (1985) não observaram alterações morfológicas nas uniões intercelulares.

SOSULA et al. (1972b) e DANIS & YANG (1993) encontraram maior número de uniões em capilares de ratos diabéticos, o que, segundo eles, seria um sinal sugestivo de proliferação de células endoteliais. PAPACHRISTODOULOU & HEATH (1977), ao contrário, não observaram alteração quanto ao número de uniões intercelulares em ratos diabéticos. A proliferação de células endoteliais pode ser visualizada com maior facilidade usando-se técnicas diferentes das utilizadas neste estudo, como, por exemplo, a digestão tripsínica que pode demonstrar diversas alterações relacionadas ao diabetes, tais como proliferação endotelial, perda pericítica, acelularidade de capilares, microaneurismas, tortuosidades e irregularidades do calibre vascular. (TOUSSAINT & DUSTIN, 1963; KUWABARA & COGAN, 1965; PAPACHRISTODOULOU et al., 1976; PAPACHRISTODOULOU & HEATH, 1977; CARDOZO-CABRAL, 1978).

Os núcleos de células endoteliais apresentaram novamente dispersão da cromatina, como já citado, sinal de síntese aumentada. No citoplasma, as células endoteliais diabéticas apresentaram alterações semelhantes às que ocorreram nas demais células retínicas, ou seja, edema mitocondrial, gotas lipídicas e aumento de glicogênio livre, corpos densos, lisossomos e vacúolos contendo restos necróticos em absorção, formando as imagens de "figuras de Mielina", conforme também observado por WATANABE (1973). As gotas lipídicas foram anteriormente relatadas no endotélio diabético do ser humano por TOUSSAINT & DUSTIN (1963), sendo comum encontrá-las na retinopatia diabética (VRACKO, 1974).

Outros autores observaram, em olhos humanos de portadores de diabetes de longa evolução, graus intensos de sofrimento nuclear, como cariorrexis, cariólise, lipofucsina perinuclear, diminuição do número de núcleos (KUWABARA & COGAN, 1965), até o total desaparecimento das células endoteliais (TOUSSAINT & DUSTIN, 1963).

As vesículas pinocitóticas intracitoplasmáticas apresentaram algumas características interessantes. Foram mais numerosas na região próxima à MB, sendo que algumas vezes foram obtidas imagens mostrando continuidade das vesículas com a membrana plasmática endotelial ou pericítica. Os vasos maiores e os animais diabéticos apresentaram maior número de vesículas pinocitóticas.

Estariam elas relacionadas com o transporte trans-citoplasmático? O seu acúmulo maior perto da MB sugere que esse transporte seja mais intenso do tecido para a luz vascular? Os animais diabéticos possuindo-as em maior número, teriam-nas como responsáveis pela remoção de detritos do tecido retínico agredido? RAVIOLA & BUTLER (1983, 1985) usando injeção de peroxidase intravítrea em coelhos e macacos, demonstraram sua passagem por meio de vesículas do endotélio até o lúmen. Os autores sugerem que esse caminho possa servir para a remoção de moléculas potencialmente tóxicas do interstício da retina.

GORDON & ESSNER (1985) injetaram peroxidase, microperoxidase e lactoperoxidase no vítreo de ratos e observaram a presença das proteínas dentro de corpos multivesiculares, sugerindo que elas foram endocitadas e seriam digeridas por lisossomos. Nesse mesmo estudo e em estudo subsequente (ESSNER et al., 1986), os autores não encontraram traçadores na luz vascular e concluíram que as vesículas são invaginações da membrana plasmática, não estando envolvidas em transcitose ou endocitose de proteínas.

LIN & ESSNER (1986) injetaram lactoperoxidase e peroxidase por via endovenosa em ratos normais e observaram que estes traçadores protéicos são encontrados no lúmen de capilares retinianos e também em vesículas citoplasmáticas concentradas junto ao lúmen e em menor quantidade em direção à região subluminal, nunca dentro da MB ou no espaço perivascular.

CALDWELL & SLAPNICK (1992) observaram, usando técnica de criofratura, a presença de vesículas na face interna das células endoteliais e externa dos pericitos e sugeriram ser este um sinal de alteração no turnover da matriz extracelular.

Portanto, o papel dessas vesículas ainda permanece não estabelecido. O fato delas ocorrerem em maior concentração junto à MB nos leva a apreciar a idéia de RAVIOLA & BUTLER (1983, 1985) que sugerem ser esse um indício de que o transporte transvesicular seja mais intenso do meio extravascular para o intravascular.

O encontro de maior número de vesículas em capilares de ratos diabéticos vem novamente favorecer a idéia de RAVIOLA & BUTLER (1983, 1985) que as consideram responsáveis pela remoção de substâncias tóxicas do interstício.

Os pericitos revestem as células endoteliais total ou parcialmente. Segundo ASHTON & OLIVEIRA (1966), o termo pericito foi introduzido por ZIMMERMANN, que descreveu células pericapilares que se coravam pela prata, presentes em vários tecidos de diferentes animais. Para KUWABARA & COGAN (1963)

e COGAN & KUWABARA (1967), o termo mais correto seria célula mural, uma vez que essas células fazem parte da parede vascular e não se posicionam apenas, ao redor dos vasos. No entanto, ASHTON & OLIVEIRA (1966) e OLIVEIRA (1966), estudando capilares de várias localizações do olho e de outras partes do corpo, sugerem a manutenção do termo pericito, já que não observaram diferenças morfológicas entre eles.

A função dos pericitos é, ainda, discutível. Há quem lhes atribua função de suporte da parede vascular, regulando o calibre do vaso (FISHER, 1980).

GORDON & ESSNER (1986) descreveram microfilamentos ancorados entre células endoteliais e pericíticas, provavelmente conferindo-lhes função contrátil.

Segundo KUWABARA & COGAN (1963) e COGAN & KUWABARA (1967), os pericitos estão envolvidos no controle do fluxo sanguíneo e são lesados seletivamente na retinopatia diabética. Todavia, OLIVEIRA (1966) e COGAN & KUWABARA (1967) relataram a perda de pericitos em outras patologias sugerindo que as alterações diabéticas dependem mais de alterações hemodinâmicas que da perda pericítica.

Os pericitos são ricos em organelas citoplasmáticas, indicando que possuem função metabólica importante. Neste estudo, os animais diabéticos apresentaram alterações mais acentuadas em pericitos do que em células endoteliais. Os núcleos pericíticos apresentaram aumento no tamanho, com dispersão da cromatina e os mesmos agregados observados nos núcleos das demais camadas retinianas. No citoplasma, foram novamente observados o edema mitocondrial e os acúmulos de glicogênio, corpos residuais, lisossomos, além de vacúolos. TOUSSAINT & DUSTIN (1963) observaram, em pericitos de olhos humanos diabéticos, lesões mitocondriais do aparelho de Golgi e aumento dos restos celulares. Em pericitos de ratos diabéticos há relatos de edema mitocondrial, grânulos intramitocondriais, acúmulo de glicogênio livre

e sinais de necrose celular (SOSULA et al., 1972b; WATANABE, 1973; LEUENBERGER et al., 1974; ROBISON et al., 1990).

Quanto ao aumento de vesículas intracitoplasmáticas, são válidas as observações aqui apresentadas para as de células endoteliais.

Observou-se que as alterações pericíticas foram evolutivas, tornando-se mais intensas que as alterações endoteliais e nos animais portadores de diabetes há mais tempo. Também LEUENBERGER et al. (1974) encontraram mais alterações pericíticas que endoteliais. Animais em M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub> apresentaram alguns pericitos com degeneração total do núcleo e citoplasma, ficando sem evidências de organelas, o que ROBISON et al. (1990) chamaram de "pericito fantasma". A perda pericítica já foi observada por outros (TOUSSAINT & DUSTIN, 1963; BABEL & LEUENBERGER, 1974; PAPACHRISTODOULOU et al., 1976; RODRIGUES et al., 1983; NAESER & ANDERSON, 1983).

Nos animais utilizados para este trabalho não se notou a presença de microaneurismas. Há controvérsias quanto ao desenvolvimento de microaneurismas na retina do rato diabético. LEVENE et al. (1963) comentam que os ratos diabéticos por pancreatectomia há 27 meses não apresentaram microaneurismas. FISHER (1980) também não os observou em ratos diabéticos por streptozotocina e RODRIGUES et al. (1983), em ratos diabéticos por vírus. HEATH & RUTTER (1966) observaram microaneurismas em ratos diabéticos por Aloxana, apenas após administração de iminopropionitril. A injeção desta substância, em ratos diabéticos por Aloxana ou por Estreptozotocina, promove aparecimento de zonas acelulares sem função, microaneurismas fusiformes e depósitos PAS positivos em capilares (DUHAULT et al., 1974). CAMERON et al. (1971) e BABEL (1982) observaram microaneurismas fusiformes e saculares em ratos diabéticos por estreptozotocina.

ENGERMAN et al. (1982) chamam a atenção para o fato de que os microaneurismas de ratos, coelhos e camundongos não possuem morfologia comparável

aos do ser humano e que não são facilmente reproduzíveis. Segundo BABEL & LEUENBERGER (1974), LEUENBERGER et al. (1974) e BELL & HYE (1983), há desenvolvimento de microaneurismas fusiformes em ratos diabéticos há mais de 6 meses. BABEL (1982) observou microaneurismas fusiformes e escassos saculiformes.

O presente estudo envolveu animais com até 12 e  $1/2$  meses (M<sub>5</sub>) de diabetes e não foram encontrados microaneurismas. HORI & MUKAY (1980) também não os encontraram em ratos diabéticos de 12 meses, sugerindo que o curto tempo de acompanhamento dos animais pode ser o responsável pela não observação dos microaneurismas.

O aparecimento precoce de microaneurismas, assim como a intensificação das lesões diabéticas, é favorecido por dietas especiais, ricas em sucrose (PAPACHRISTODOULOU et al., 1976) ou em galactose (NAGATA et al., 1987; ROBISON et al., 1989). Em ratos normais COHEN et al. (1972) induziram retinopatia semelhante à diabética, inclusive com presença de microaneurisma, usando apenas dietas ricas em sucrose durante 12 a 21 meses.

Segundo YANOFF (1969), os microaneurismas formam-se em locais onde a parede vascular é mais fina. Alguns relacionam o seu aparecimento à degeneração pericítica (COGAN et al., 1961; BLOODWORTH & MOLITOR, 1965; VRACKO, 1974). Outros à degeneração de células de Müller adjacentes aos vasos (HORI & MUKAY, 1980).

Qual seria o motivo de o rato diabético não apresentar microaneurismas? HOGAN & FEENEY (1963a) observaram que na união entre a membrana basal endotelial e pericítica, do homem e do macaco, há espaços. No rato, porém, os vasos estão apostos às células vizinhas, sem espaços perivasculares os quais seriam importantes para a formação dos microaneurismas (HOGAN & FEENEY, 1963a; FISCHER & GARTNER, 1983).

Além dos fatores apontados, deve-se realçar que o encontro dos microaneurismas poderia ser feito com maior facilidade usando-se as técnicas de digestão tripsínica da retina, como feito por muitos dos pesquisadores que os descreveram (BABEL & LEUENBERGER, 1974; ASHTON, 1974; PAPACHRISTODOULOU et al., 1976).

Os animais do GT apresentaram algumas alterações em células endoteliais e pericíticas, semelhantes às observadas em ratos do GD, porém com intensidade inferior.

Portanto, com relação às alterações em células endoteliais e pericíticas observadas pode-se dizer que: os ratos do GC em M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub> apresentaram acúmulos de glicogênio, corpos densos, vacúolos e vesículas intracitoplasmáticas; os animais do GD apresentaram esses acúmulos mais intensa e precocemente; as alterações dos pericitos foram mais acentuadas que as das células endoteliais; não se observou a presença de microaneurismas em ratos diabéticos; mesmo animais do GT apresentaram algumas das alterações encontradas em células endoteliais e pericíticas do GD, porém em menor intensidade.

No levantamento da literatura observou-se que o número de publicações a respeito de alterações da membrana basal (MB) é indiscutivelmente maior que sobre qualquer outro aspecto da retinopatia diabética.

A MB vascular do rato possui a mesma estrutura que a do ser humano, exceto pela ausência de espaços perivasculares (HOGAN & FEENEY, 1963a), conforme referido anteriormente.

Em alguns animais do GC, geralmente nos mais velhos, observou-se a presença de acúmulos osmiofílicos dentro ou fora da MB, e um deles apresentou espaços claros, como se houvesse vacuolização da MB. Na MB de animais idosos pode-se observar vacuolização e aumento da espessura (HOGAN & FEENEY, 1963a, KUWABARA & COGAN, 1965; LEUENBERGER, 1973; NAGATA et al., 1986).

No GD a MB apresentou vários tipos de alteração. O primeiro a notar alterações na MB da retina diabética foi FRIEDENWALD (1950). Sabe-se que não só a retina, mas também o rim, a pele, o músculo e a placenta podem apresentar alterações da MB decorrentes do diabetes (BLOODWORTH et al., 1969; SIPERSTEIN, 1972; KILO et al., 1972).

A MB dos ratos do GD apresentou aumento de espessura não homogêneo como também observado por outros (WILLIAMSON & KILO, 1969; LEUENBERGER et al., 1974; BABEL, 1982; FISCHER & GARTNER, 1982; 1983; BLAIR et al., 1984; VINOES et al., 1988; DANIS & YANG, 1993). O aumento foi mais acentuado sobre os pericitos ou nos locais de união entre MBE e MBI. O espessamento da MB na retinopatia diabética do ser humano e de animais já foi repetidamente demonstrado (KISSEN & BLOODWORTH, 1961; TOUSSAINT & DUSTIN, 1963; BLOODWORTH & MOLITOR, 1965; BLOODWORTH et al., 1969; ASHTON, 1974; ROBISON et al., 1983; DAS et al., 1990).

Os acúmulos osmiofílicos observados no GC a partir do M3, no GD ocorreram já em M<sub>1</sub>, sendo mais freqüentes e mais grosseiros no GD, provavelmente mostrando a tendência de antecipação das alterações senis nos diabéticos.

Do que resultariam esses acúmulos osmiofílicos? TOUSSAINT & DUSTIN (1963) apontam o acúmulo de debris na MB como resultante da destruição de células murais e infiltração de lípidos e ferritina. PAPACHRISTODOULOU & HEATH (1977) observaram perda da homogeneidade da MB, contendo material osmiofílico, debris celulares e estriações fibrilares semelhantes ao colágeno. Acúmulos lipídicos e de colágeno também foram sugeridos por outros (KUWABARA & COGAN, 1965; BLOODWORTH & MOLITOR, 1965; MUKAI, 1971; ASHTON, 1974; BABEL & LEUENBERGER, 1974; DAS et al., 1990).

Os espaços eletrontransparentes, também observados por BABEL (1982), ou vacuolizações da MB, foram mais freqüentes e precoces nos animais do GD e

são semelhantes às vesiculações em "queijo suíço", observadas por BLOODWORTH & MOLITOR (1965) na MB da retina diabética humana e de cães.

As projeções da MB em direção a células vizinhas, observadas poucas vezes nos animais do GC e mais freqüentes nos do GD, foram também verificadas, por outros, na retina diabética do ser humano e de animais (BLOODWORTH & MOLITOR, 1965; BABEL & LEUENBERGER, 1974; PAPACHRISTODOULOU & HEATH, 1977; BABEL, 1982; FISCHER & GARTNER, 1983; ROBISON et al., 1986). A persistência da MB, quando todos os componentes da parede vascular degeneraram sugere que a MB é mais resistente à degeneração (ROBISON, et al. (1990)), ou que a sua degradação esteja diminuída.

Portanto, a MB dos ratos do GD mostrou-se espessada de forma não homogênea, com acúmulos osmiofílicos, debris celulares, vacuolização e projeções da MB em direção a células vizinhas mais freqüentes que no GC. Os animais do GT apresentaram alterações na MB, porém muito mais discretas, mostrando que o tratamento foi útil.

Outros comentários sobre a MB serão feitos quando a ela se fizerem referências no exame morfométrico.

As alterações das células perivasculares, como edema e acúmulo de corpos residuais, lisossomos e glicogênio, observadas em ratos diabéticos, foram muito evidentes e ocorreram em todas as camadas retinianas e principalmente em animais submetidos a descontrole metabólico por maior tempo. Os prolongamentos citoplasmáticos das células de Müller rodeiam grande número de vasos, e as importantes alterações da microcirculação diabética, como necrose e degeneração de pericitos e células endoteliais, podem ser responsáveis pela ativação do sistema de fagocitose das células de Müller. Essas células podem ainda infiltrar-se nos capilares necróticos, substituindo-os (BLOODWORTH & MOLITOR, 1965; TANIGUCHI & NOMURA, 1968).

As células sanguíneas e as granulocíticas, nos animais estudados, estiveram sempre restritas ao meio intravascular. Sabe-se que no ser humano as hemorragias e os exsudatos estão ligados à gênese das alterações diabéticas, porém neste estudo não foram observadas hemácias no meio extravascular ou em diapedese. As hemácias poderiam ter sido englobadas pelas células gliais e estar em digestão dentro dos corpos residuais. Entretanto, não foram encontrados traços de hemácias em absorção no tecido vizinho, nem na MB vascular, como relatado anteriormente por outros (TOUSSAINT & DUSTIN, 1963; BABEL, 1982).

Também não foram encontrados, neste experimento, monucleares no espaço perivascular, embora BLOODWORTH & MOLITOR (1965) os tenham observado em homens e cães portadores de RD.

Em animais do GD, em M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub>, observaram-se oclusões vasculares às custas de debris celulares. ROBISON et al (1989) também as observaram. As oclusões vasculares são muito importantes na gênese da retinopatia diabética e delas decorre a hipóxia tecidual, seguida por alterações isquêmicas e necróticas (VRACKO, 1974; JERNELD, 1988).

KUWABARA & COGAN (1965) e ROBISON et al. (1990) observaram que capilares acelulares acabam sendo preenchidos por células gliais adjacentes.

Trombos eritrocitários ou plaquetários não foram observados no presente estudo. BLAIR et al. (1984) também não os encontraram, apesar de haver relatos de sua existência (MacMILLAN, 1975; BELL et al., 1980; ISHIBASHI et al., 1981; 1985).

FRIEDENWALD (1950) acreditava que o uso da insulina e a normalização da glicemia não alteravam a evolução da retinopatia. Para tratamento do estado hiperglicêmico grave provocado pela Aloxana, utilizou-se hipoglicemiante oral associado a insulina. Porém, o controle glicêmico dos animais, neste estudo, não foi

perfeito, o que pode ter resultado nas lesões observadas no GT. Entretanto, o tratamento influenciou positivamente sobre o tecido retiniano, uma vez que as alterações do GT foram muito mais discretas que as do GD.

#### **4.2.3. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS VASOS RETINIANOS**

Para o exame morfométrico, optou-se pelo estudo dos vasos da camada ganglionar (CG) como representativos do plexo superficial, e o dos vasos da camada plexiforme externa (CPE) como representativos do plexo profundo. A escolha baseou-se no fato de tais camadas abrigarem um maior número de vasos, conforme também já observado por SOSULA et al. (1972a). Escolheram-se vasos com três ou menos células endoteliais para trabalhar-se apenas com capilares, segundo a definição de HOGAN & FEENEY (1963a), e também porque o calibre vascular e as estruturas do vaso são proporcionais (VRACKO & STRANDNESS, 1967; WILLIAMSON et al., 1969).

Os vasos dos dois plexos foram analisados separadamente com base em informações da literatura, segundo as quais, os plexos respondem diferentemente às alterações metabólicas diabéticas (BALLANTYNE & LÖWENSTEIN, 1943; YANOFF, 1969).

O estudo desses vasos foi feito com aparelho computadorizado (Mini-Mop), avaliando-se a área das células endoteliais, dos pericitos, da membrana basal e do lúmen vascular.

Quanto à área das células endoteliais foi possível observar-se que nos vasos da CG só houve diferença estatisticamente significativa no GT em M<sub>2</sub>, quando o valor médio da área foi menor no GT que no GD. Esse fato poderia ser decorrente da coincidência de medidas feitas em vasos compostos por menor número de células endoteliais no GT.

Já nos vasos da CPE, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística entre os grupos, os valores obtidos para a área das células endoteliais do GD foram sempre superiores aos do GC. Segundo ASHTON (1963), a hipóxia leva ao aumento edematoso da célula endotelial. O aumento da área das células endoteliais dos vasos retinianos foi observado por SOSULA et al. (1972b) em ratos com um mês de diabetes e interpretado como uma reação inespecífica da célula endotelial às alterações metabólicas, decorrentes de proliferação endotelial, ou indicativo de edema devido ao acúmulo do polyol. Como proposto na hipótese do sorbitol, o polyol difunde-se mal através das membranas celulares, e o seu acúmulo intracelular leva ao aumento da osmolaridade e a edema celular (BEAUMONT et al., 1971).

Em relação à análise dos momentos, tanto os vasos da CG, como os da CPE, não mostraram diferenças entre as médias dos valores de área de células endoteliais em nenhum dos momentos.

Quanto aos valores médios da área dos pericitos dos vasos da CG, na comparação entre os grupos e também entre os momentos, observou-se que o valor obtido para o GT em M<sub>2</sub> foi menor, sendo responsável pela diferença estatisticamente significativa encontrada. Pode-se acreditar que esse fato não reflete alteração biológica significativa, uma vez que seria de se esperar maior perda pericítica em animais sem tratamento. Na comparação entre momentos, como explicar que no GT os valores médios da área pericítica foram menores que nos demais momentos? O aumento da área pericítica após o M<sub>2</sub>, talvez pudesse decorrer de regeneração pericítica, o que, pelas observações qualitativas, parece não ocorrer. Voltando à análise da área das células endoteliais, nota-se que foi justamente nesse grupo e nesse momento que se obteve diferença significativa por menor valor médio de área, reforçando a idéia de que os vasos medidos, nesse grupo e nesse momento, possam ser menores que os demais.

A média da área dos pericitos dos vasos da CPE não mostrou diferença entre grupos ou entre momentos. Avaliando a área pericítica por meio de

planimetria, SOSULA et al. (1972b) não observaram diferença entre ratos normais e diabéticos há 1 mês, e TILTON et al. (1986) em ratos diabéticos há 9 meses. Estes últimos sugerem, ainda, que o rato não apresenta perda seletiva de pericitos. Porém, NAGATA et al. (1986) comentam existir perda seletiva de pericitos na RD. Segundo LEUENBERGER & BABEL (1978), há, inicialmente, aumento da área pericítica por edema, seguida de diminuição por alterações degenerativas. FISHER (1980) acredita que, sendo o papel dos pericitos impedir a dilatação vascular, no estado diabético eles devem sofrer um aumento, na tentativa de exercer força contrátil maior.

As alterações qualitativas encontradas em pericitos de ratos diabéticos não correspondem às alterações quantitativas apontadas pelo exame morfométrico. Isto, provavelmente, decorreu do fato de as medidas morfométricas terem sido feitas indistintamente sobre pericitos viáveis e degenerados, uma vez que, mesmo após a degeneração pericítica, o seu compartimento permanece (ROBISON et al., 1990). Se apenas os pericitos "funcionantes" fossem contados, provavelmente, os resultados seriam outros.

Como referido anteriormente, a MB é o alvo maior de estudos sobre o diabetes, e as alterações mais significativas encontradas na avaliação morfométrica estiveram a ela relacionadas.

Segundo WILLIAMSON & KILO (1977), o melhor índice para monitorizar os efeitos deletérios no sistema vascular é fazendo-se avaliação de MB.

Existem vários métodos de medida da MB. SIPERSTEIN et al. (1968) relataram o aumento da MB utilizando o método manual de medida, com a interposição de um diagrama contendo 20 linhas radiais, distando 18 graus uma da outra, desenhado sobre uma tela plástica transparente colocada sobre as micrografias. Segundo WILLIAMSON et al. (1969), a chance de erro aumenta com o método de SIPERSTEIN et al. (1968). KILO et al. (1972) e SIPERSTEIN et al. (1973) sugeriram o "método de medida mínimo", pelo qual se deve medir em dois pontos, justamente no local onde a MB

é mais estreita, visando a eliminar o erro induzido pelos cortes tangenciais e elípticos. SIPERSTEIN et al. (1973) estimaram o erro induzido por medidas feitas segundo seu método em aproximadamente 10%, e pelo método de WILLIAMSON et al. (1969), em cerca de 20 a 40%. ROSSI & HELDSTAB (1981) estudaram morfometricamente vasos de ratos diabéticos usando planímetro computadorizado e empregando expressões matemáticas para chegar ao valor de espessura da MB. ROBISON et al. (1983), também usando aparelho computadorizado equipado com cursor tipo caneta, quantificaram a área da MB de vasos de ratos diabéticos de forma simplificada, sendo aquela resultante da medida total da área vascular menos as áreas do pericito, do endotélio e do lúmen vascular. Esses autores colocam como critérios para escolha adequada dos vasos a serem analisados, apenas medir vasos cortados transversalmente a 90 graus e com limites perfeitamente distintos.

Apesar de o aparelho utilizado neste experimento (Mini-Mop) ser diferente daquele que ROBISON et al. (1983) utilizaram, foram seguidas suas diretrizes. A área total do vaso foi medida, excluindo-se em seguida todas as estruturas localizadas internamente à membrana plasmática de células endoteliais e/ou pericíticas. Este é provavelmente o melhor método, porque evita que o investigador tenha tendência a escolher um local errôneo para sua avaliação, além do quê, o espessamento da MB não é homogêneo, como já relatado.

Além do método de medida, outros fatores são essenciais para uma correta avaliação; ou: a escolha de grupos homogêneos, a correção dos erros metodológicos, a comparação de vasos de mesmo calibre, localizados em regiões semelhantes, a obtenção de micrografias com mesmo tamanho e boa resolução da imagem, a realização das medidas sempre pelo mesmo experimentador.

O fator "idade" é bastante importante na montagem do grupo experimental quando se trata do rato, que possui vida curta e rápida instalação dos fenômenos de involução senil (GLATT & HENKIND, 1979; BELL & HYE, 1983).

Os animais utilizados no presente trabalho não apresentaram diferença significativa entre os grupos, no tocante à área média da MB de vasos localizados na CG. Observou-se, porém, uma nítida tendência de o GD ter valores médios de área mais elevados que o GC e o GT. Os vasos da CPE de ratos do GD também apresentaram valores de média de área da MB maiores que os do GC e do GT, com níveis estatisticamente significativos em M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub>. Portanto, vasos da CG e da CPE apresentaram aumento da MB, porém os vasos da CPE tiveram maior alteração. Os ratos diabéticos de CAMERON et al. (1971) apresentaram aumento do MB com o aumento da idade e não relacionado à severidade do diabetes.

Por que os vasos da CPE responderiam com aumento maior de espessura da MB que os da CG? Segundo YANOFF (1969), os vasos da CPE são mais "incompetentes", levando à maior número de alterações nesta região. SOSULA et al.(1972b) encontraram diminuição de espessura da MB em vasos da camada de fibras nervosas e da camada plexiforme interna, enquanto os da CPE não se alteraram em ratos diabéticos há 1 mês. Já CHAKRABARTI & SIMA (1987) observaram MB de vasos da CG e da CPE com igual espessura com a normalização da glicemia usando insulina; porém, usando insulina associada à aldose reductase, observaram espessamento maior da MB de vasos superficiais que profundos, sugerindo diferentes mecanismos envolvidos com o espessamento da MB. Portanto, desconhece-se o porquê de, neste estudo, os vasos da CPE apresentarem maior aumento da MB, sendo a literatura controversa nesse aspecto.

Observou-se, neste trabalho, que os animais do GD apresentaram valores médios de área da MB na CG e na CPE, progressivamente maiores à partir de M<sub>1</sub> a M<sub>5</sub>, e com diferença significativa na CPE em M<sub>5</sub>. Os resultados apontam para o caráter progressivo das lesões diabéticas. Outros pesquisadores (LEUENBERGER et al., 1971; BABEL & LEUENBERGER, 1974; LEUENBERGER et al., 1974; PAPACHRISTODOULOU & HEATH, 1977; BABEL, 1982; VINOES et al., 1988)

também relataram que as alterações da espessura da MB ocorrem após algum período de tempo de exposição ao estado diabético.

A MB dos vasos, principalmente da CPE, de animais do GT teve tendência a ser menos espessa que nos animais do GD, novamente mostrando o benefício do tratamento. KILO et al. (1972) relataram que o "turnover" da MB é lento e que a normalização da glicemia não leva a MB imediatamente ao normal. Para CHAKRABARTI & SIMA (1981), a normalização da glicemia previne o aumento da MB.

Nesta investigação realizaram-se medições na MBE. Outros autores compararam medidas da MBE e MBI, observando que a MBE apresenta espessamento maior (BLOODWORTH, 1967; ASHTON, 1974; FISCHER & GARTNER, 1983). FISCHER & GARTNER (1982) observaram que as células de Müller de ratos diabéticos apresentam espessamento de sua lâmina basal, sugerindo que o aumento de espessura da MBE seja, em parte, devido ao aumento da MB da célula de Müller ou células gliais.

Apesar da riqueza de estudos a respeito da MB, muito pouco se conhece sobre ela. Por que ocorre o espessamento da MB? De que ele decorre? Quais seriam suas consequências?

Muitos acreditam que o espessamento da MB decorre do acúmulo de diferentes substâncias, como detritos celulares, lípidos, colágeno (TOUSSAINT & DUSTIN, 1963; BLOODWORTH & MOLITOR, 1965; KUWABARA & COGAN, 1965; BABEL & LEUENBERGER, 1974; PAPACHRISTODOULOU & HEATH, 1977; RODRIGUES et al., 1983; DAS et al., 1990). Para WILLIAMSON & KILO (1969), o espessamento da MB não é estático, dependente apenas do acúmulo de substâncias, mas pode ser influenciado por alterações hemodinâmicas, como o aumento da permeabilidade vascular.

A MB funciona como uma barreira de filtração seletiva e é composta de carboidratos, peptídeos, hidroxilisina, hidroxiprolina e glicina (ASHTON, 1974). Segundo WILLIAMSON & KILO (1976), o aumento da MB ocorre por acúmulo

glicoprotéico. ROBISON et al. (1989) acreditam que seria o aumento de mucopolissacarídeos que levaria à alteração da MB.

Alterações bioquímicas foram largamente investigadas. MACMILLAN (1975) relatou aumento da atividade enzimática responsável pela aderência glicose/galactose à MB, porém não observou alterações na composição da MB diabética. Para SPIRO (1976) a alteração na síntese da MB diabética deve ser pós-ribossômica, ou seja, afeta a hidroxilação, a glicolização, a exportação e a formação de "cross-link". REDDI (1985) encontrou aumento de hidroxiprolina e de glucosiltransferase em ratos diabéticos, demonstrando que há aumento da MB no diabetes, por aumento da síntese do colágeno.

WILLIAMSON & KILO (1977) acreditam que a MB se torne espessa por aumento da síntese e diminuição da degradação. RODRIGUES et al. (1983) sugerem que o aumento da MB decorre de acúmulo de produtos decorrentes da morte celular e de sua reposição.

O desenvolvimento de modelos experimentais usando dietas ricas em galactose (KINOSHITA & NISHIMURA, 1988) e a prevenção de lesões similares às diabéticas com o uso de inibidores da aldose redutase, sugerem o envolvimento do ciclo do polyol no desenvolvimento das lesões diabéticas (ROBISON et al., 1986; 1989; 1990). Estudos utilizando técnicas imuno-histoquímicas revelam que os inibidores da aldose redutase atuam prevenindo o aumento da permeabilidade a pequenas moléculas, bloqueando alterações bioquímicas específicas relacionadas com a síntese do colágeno, impedindo o espessamento da MB (DAS et al., 1990). Também o uso de radicais livres parece prevenir as alterações diabéticas (DOLY et al., 1992)

Já no início dos estudos sobre alterações diabéticas da MB, SIPERSTEIN et al. (1968) e SIPERSTEIN (1972) sugeriam que o espessamento da MB é primário, independente da glicemia e decorrente de fator genético predisponente. Para LEUENBERGER (1973) as alterações da MB, no diabetes são acelerados, mas não

causados pelas alterações diabéticas. Para ROSSI & HELDSTAB (1981), apenas a hiperglicemia já é suficiente para levar ao aumento da MB, mas acreditam também na existência de fatores genéticos e imunológicos relacionados.

FISCHER & GARTNER (1983) não encontraram correlação entre o aumento da MB e a severidade do diabetes.

Portanto, o espessamento da MB, que pode ser complicação do estado de deficiência insulínica, provavelmente possui patogênese multifatorial. É influenciado pela hiperglicemia; por alterações enzimáticas e bioquímicas de seus componentes; por aumento da síntese e diminuição de sua degradação, além dos fatores genéticos e imunológicos.

Quanto à área média do lúmen vascular, não se observaram neste estudo, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ou entre os momentos nos vasos da CG ou nos da CPE. Encontrou-se, apenas, uma tendência a calibre maior em vasos da CG nos ratos do M<sub>5</sub> quando comparados com M<sub>1</sub> em todos os grupos.

DUHAULT et al. (1974) estudaram medidas do diâmetro vascular, tendo encontrado diâmetro maior em ratos diabéticos. SOSULA et al. (1972b) encontraram aumento da área de capilares formados por apenas 1 ou 2 células endoteliais, concluindo que os pequenos vasos são os mais afetados.

O aumento da glicose sanguínea leva à vasodilatação e estase, acarretando hipóxia (ELWIN, 1941). O calibre vascular, principalmente venoso, aumenta em resposta à hipóxia (SEBAG & McMEEL, 1986) e a alterações metabólicas retinianas, aumentando, por sua vez, o fluxo sanguíneo. No entanto, o aumento do calibre é reversível e transitório (DITZEL, 1968).

Para WILLIAMSON & KILO (1977) o aumento da pressão arterial poderia levar à distensão vascular.

TOUSSAINT & DUSTIN (1963) encontraram diminuição da luz em humanos diabéticos. PAPACHRISTODOULOU & HEATH (1977) relataram diminuição

da luz vascular em animais diabéticos há 6 meses. A diminuição do lúmen vascular poderia ser decorrente da regeneração do endotélio e do pericito (VRACKO, 1974).

Portanto, neste trabalho, não se constataram quaisquer diferenças entre os grupos. Há relatos sobre o aumento e sobre a diminuição da luz vascular em capilares diabéticos. A divergência de opiniões é provavelmente, devida à ampla gama de fatores envolvidos na regulação do calibre vascular.

O estudo morfométrico, aqui apresentado, mostrou pontos importantes da retinopatia diabética como: o caráter crônico e evolutivo das lesões, a sua presença em vasos superficiais ou profundos e o efeito benéfico do tratamento, além de indicar ser a MB a porção quantitativamente mais afetada do sistema vascular.

Com relação às alterações observadas na retina de ratos diabéticos por Aloxana, foi notavelmente observado que os animais não reproduzem todos os aspectos da retinopatia diabética humana, como já citado por outros autores (ENGERMAN et al., 1982; BELL & HYE, 1983; YASUDA et al., 1984; JONASSON et al, 1985). Não só a hiperglicemia, mas muitos outros aspectos podem estar envolvidos, como por exemplo, a associação dos distúrbios metabólicos com a hipertensão arterial que triplica a propensão à retinopatia, (WEST et al., 1980).

Os vários aspectos que apontamos, assim como a grande quantidade de estudos nesta área, demonstram a complexidade da retinopatia diabética. À despeito das inúmeras pesquisas, realizadas, clínicas e experimentais, há ainda muitos pontos em sua etiologia e fisiopatologia aguardando elucidação.

## 5 CONCLUSÕES

### - Quanto à morfologia das camadas retinianas:

- a retina de ratos mostrou composição tecidual e celular semelhante à do ser humano;
- os animais normais mais velhos apresentaram maior frequência de "cistos glicogênicos", lisossomos e corpos densos;
- os animais diabéticos sofreram alterações teciduais e vasculares em todas as camadas retinianas; o núcleo celular apresentou dispersão da cromatina e agregados excêntricos; no citoplasma ocorreu aumento de glicogênio livre, "cistos de glicogênio", lipídeos, corpos densos, lisossomos, vacúolos com "figuras de Mielina", além de rarefação por diminuição de organelas;
- os ratos diabéticos mais velhos apresentaram alterações mais intensas, em todas as camadas retinianas, mostrando o caráter progressivo das lesões diabéticas;
- as células de Müller sofreram alterações mais profundas que as demais;
- os ratos não apresentaram hemorragias ou microaneurismas;
- as alterações foram menos frequentes e menos intensas nos ratos diabéticos tratados, mostrando que o controle glicêmico reduziu a intensidade das lesões teciduais diabéticas.

### - Quanto à vasculatura retiniana:

- os animais normais mais idosos mostraram acúmulos osmio fílicos e vacuolização da membrana basal;
- os ratos diabéticos apresentaram células endoteliais e pericitos com

alterações nucleares e citoplasmáticas se semelhantes às observadas nas demais células retinianas;

- os pericitos tiveram alterações mais intensas que as células endoteliais;
- os ratos diabéticos apresentaram alterações vasculares mais precoces e mais intensas que os ratos normais;
- a membrana basal mostrou espessamento heterogêneo, acúmulos osmiofílicos e vacuolização na fase inicial da evolução da doença;
- a área da membrana basal foi maior nos ratos diabéticos, principalmente nos vasos da CPE e nos animais mais velhos, reforçando a progressividade das lesões diabéticas;
- os ratos diabéticos apresentaram oclusão de alguns vasos, por debris celulares;
- os ratos diabéticos que receberam tratamento apresentaram lesões vasculares menos intensas.

## 6 RESUMO

Em 60 ratos da raça Wistar divididos igualmente em 3 grupos experimentais - grupo normal (GC), grupo diabético (GD) e grupo diabético tratado (GT) foram realizados exames histopatológico, ultraestrutural e morfométrico da retina.

O diabetes foi induzido por Aloxana e o tratamento feito com insulina associada a hipoglicemiante oral (Acarbose).

As observações foram efetuadas em 5 momentos experimentais: 1<sup>1/2</sup>, 3<sup>1/2</sup>, 6<sup>1/2</sup>, 9<sup>1/2</sup> e 12<sup>1/2</sup> meses após a indução do diabetes, e os resultados submetidos a análise de variância, adotando-se o nível de significância de 5%.

No estudo comparativo das 10 camadas retinianas, os ratos do GD apresentaram alterações do núcleo celular (cromatina descondensada e agregados cromáticos excêntricos) e do citoplasma (acúmulos de corpos densos, lisossomos, corpos residuais contendo "figuras de Mielina", glicogênio e rarefação citoplasmática). As células perivasculares, principalmente as de Müller, foram as que sofreram mais alterações. Os animais do GT apresentaram alterações celulares menos intensas que os do GD.

Os vasos retinianos dos ratos do GD apresentaram alterações semelhantes às das demais células retinianas. As alterações dos pericitos foram mais intensas que as das células endoteliais. A membrana basal (MB) apresentou espessamento não homogêneo, acúmulos osmiofílicos, vacuolização e maior quantidade de projeções rumo às células adjacentes.

Não se observaram hemorragias ou microaneurismas.

O exame morfométrico demonstrou aumento da área da MB dos vasos dos ratos do GD, principalmente os situados na camada plexiforme externa.

Todas as alterações tiveram caráter progressivo, sendo mais acentuadas nos animais mais velhos.

O tratamento diminuiu as alterações provocadas pelo diabetes aloxânico.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ASHTON, N. Vascular changes in diabetes with particular reference to the retinal vessels. Br. J. Ophthalmol, London, v.33, p.407-420, 1949.

ASHTON, N. Diabetic microangiopathy. Adv. Ophthalmol, New York, v.8, p.1-84, 1958.

ASHTON, N. Studies of the retinal capillaries in relation to diabetic and other retinopathies. Br. J. Ophthalmol, London, v. 47, p.521-538, 1963.

ASHTON, N. Vascular basement membrane changes in diabetic retinopathy. Br. J. Ophthalmol, London, v.58, p.344-365, 1974.

ASHTON, N., OLIVEIRA, F. Nomenclatura of pericytes - intramural and extramural. Br. J. Ophthalmol, London, v.50, p.119-123, 1966.

BABEL, J. Rétinopathie diabétique expérimentale. Rev. Méd. Suisse Romande, v.102, p.519-525, 1982.

BABEL, J., LEUENBERGER, P. A long term study on the ocular lesions in streptozotocin diabetic rats. Albrecht v. Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol, Heidelberg, v.189, p.191-209, 1974.

---

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: referências bibliográficas. Rio de Janeiro, 1989. 19p.

- BABEL, J., LEUENBERGER, P., CAMERON, D. et al. Rétinopathie diabétique expérimentale chez le rat. Mod. Probl. Ophthalmol, Basel, v.10, p.577-586, 1972.
- BALLANTYNE, A.J. Retinal changes associated with diabetes and with hypertension. Arch. Ophthalmol, Chicago, v.33, p.97-105, 1945.
- BALLANTYNE, A.J., LÖWENSTEIN, A. The pathology of diabetic retinopathy. Trans. Ophthalmol. Soc. UK, London, v.63, p.95-115, 1943.
- BANTING, F.G., BEST, C.H. The internal secretion of the pancreas. J. Lab. Clin. Med, St. Louis, v.7, p.251-256, 1922.
- BARRON, K.D., DENTINGER, M.P., KROHEL, G. et al. Qualitative and quantitative ultrastructural observations on retinal ganglion cell layer of rat after intraorbital optic nerve crush. J. Neurocytol, London, v.15, p.345-362, 1986.
- BEAUMONT, P., HOLLOWES, F.C., SCHOFIELD, P.J. et al. Growth hormone, sorbitol and diabetic capillary disease. Lancet, London, v.1, p.579-581, 1971.
- BELL Jr., R.H., HYE, R.J. Animal models of diabetes mellitus-physiology and pathology. J. Surg. Res., New York, v.35, p.433-460, 1983.
- BELL Jr., R.H., FERNANDEZ-CRUZ, L., BRIMM, J.E. et al. Prevention by whole pancreas transplantation of glomerular basement membrane thickening in alloxan diabetes. Surgery, St. Louis, v.88, p.31-40, 1980.

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., St. Louis, v. 25, p. 302-311, 1984.

BLANKENSHIP, G.W., SKYLER, J.S. Diabetic retinopathy - a general survey. Diabetes Care, New York, v.1, p.127-137, 1978.

BLOODWORTH Jr., J.M. Fine structure of retina in human and canine diabetes mellitus. In: KIMURA, S.J., CAYGILL, W.M. Vascular complications of diabetes mellitus. St. Louis: Mosby, 1967. p.73-98.

BLOODWORTH Jr., J.M.B., MOLITOR, D.L. Ultrastructural aspects of human and canine diabetic retinopathy. Invest. Ophthalmol., St. Louis, v.4, p.1037-1048, 1965.

BLOODWORTH Jr., J.M.B., ENGERMAN, R.L., POWERS, K.L. Experimental diabetic microangiopathy: basement membrane statistics in the dog. Diabetes, New York, v.18, p.455-458, 1969.

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 no rato. Botucatu: UNESP, 1990. 127p. Dissertação (Mestrado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 1990.

CAHILL Jr., G.F. Current concepts of diabetes. In: MARBLE, A., KRALL, L.P., BRADLEY, R.F. et al. Joslin's diabetes mellitus. Philadelphia: Lea & Fibiger,

1985. p.1-11.

CAIRD, F.I., PIRIE, A., RAMSELL, T.H. Diabetes and the eyes. Oxford: Blackwells, 1969. p.37-58.

CALDWELL, R.B., SLAPNICK, S.M. Increased cytochrome oxidase activity in the diabetic rat retinal pigment epithelium. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., St. Louis, v.30, p.591-599, 1989.

CALDWELL, R.B., SLAPNICK, S.M. Freeze-fracture and lanthanum studies of the retinal microvasculature in diabetic rats. Invest. Ophthalmol vis Sci, St. Louis, v.33, p.1610-1619, 1992.

CAMERON, D.P., AMHERDT, M., LEUENBERGER, L.O., et al. Microvascular alterations in chronically streptozotocin - diabetic rats. Europ. J. Clin. Invest., v.1, p.365, 1971

CANO, J., MACHADO, A., REINOSO-SUAREZ, F. Morphological changes in the retina of ageing rats. Arch. Gerontol. Geriatr., Amsterdam, v.5, p.41-50, 1986.

CARDOZO - CABRAL, S. Retinas normais e diabéticas. Belo Horizonte: UFMG, 1978. 110p. Tese (Doutoramento em Oftalmologia)- Faculdade de Medicina de Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 1978.

CARPENTER, P.G., TAYLOR, K.W. Statistical methods for examining retinopathy in relation to the control of diabetes and other factors. Br. J. Ophthalmol., London, v.47, p.590-595, 1963.

CHAKRABARTI, S., SIMA, A.A.F. Pathogenetic heterogeneity in retinal capillary basement membrane thickening in the diabetic BB rat. Diabetologia, Berlin, v.30, p.966-968, 1987.

COGAN, D.G., KUWABARA, T. Mural cells in perspective. Arch. Ophthalmol., Chicago, v.78 p.133-139, 1967.

COGAN,D.G.,TOUSSAINT,D.,KUWABARA,T. Retinal vascular patterns-diabetic retinopathy. Arch. Ophthalmol., Chicago, v.66, p.366-378, 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., Chicago, v.73, p.863-869, 1972.

CULLIMAN, T.R. Diabetic retinopathy and visual disability. Diabetologia, Berlin, v.23, p.504-506, 1982.

CUNHA-VAZ, J.G. Pathophysiology of diabetic retinopathy. Brit. J. Ophthalmol., London, v.62, p.351-355, 1978.

CUTHBERTSON, R.A., MANDEL, T.E. Anatomy of the mouse retina-capillary basement membrane thickness. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., St. Louis, v.27, p.1653-1658, 1986.

DAMOISEAUX, M.B., KETELSLEGERS, J.M., HILLEBRAND, I.S. et al. Effect of acarbose on blood glucose profile of totally insulin - dependent diabetic patients. Acta Clin. Belg., Bruxelles, v.38, p.5-11, 1983.

- DANIS, R.P., YANG, Y. Microvascular retinopathy in the zucker diabetic fatty rat. Invest. Ophthalm. vis Sci, St. Louis, v.34, p.2367-2371, 1993.
- DAS, A., FRANK, R.N., ZHANG, N.L. et al. Increases in collagen type IV and laminin in galactose - induced retinal capillary basement membrane thickening prevention by an aldose reductase inhibitor. Exp. Eye Res., London, v.50, p.269-280, 1990.
- DE ROBERTIS, E.D.P., DE ROBERTIS, E.M.F. O núcleo, a cromatina e os cromossomos. In:\_\_\_\_. Bases da biologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. p.173-188.
- DITZEL, J. Functional microangiopathy in diabetes mellitus. Diabetes, New York, v.17, p.388-397, 1968.
- DOLY, M., DROY - LEFAIX, M.T., BRAQUET, P. Oxidative stress in diabetic retina. EXS, v.62, p.299-307, 1992.
- DUHAULT, J., LEBON, F., BOULANGER, M. Microangiopathie diabetique-etude comparative chez l'homme et l'animal. Biorheology, Oxford, v.11, p.167-178, 1974.
- DUKE-ELDER, S. Diseases of the carbohydrate metabolism. In:\_\_\_\_. Diseases of the retina. London: Henry Kimpton, 1967. p.408-447.
- DUNN, J.S., SHEEHAN, H.L., McLETTIC, N.G.B. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. Lancet, London, v.1, p.484-487, 1943.

ELWIN, H. Problem of diabetic retinitis. Arch. Ophthalmol., Chicago, v.25, p.139-148, 1940, 1941.

ESSNER, E., LIN, W.L., GORDON, S. Surface - associated vesicles in retinal arterioles and venules. Cell. Tissue Res., Berlin, v.245, p.431-437, 1986.

ENGERMAN, R.L., BLOODWORTH Jr., J.M.B. Experimental diabetic retinopathy in dogs. Arch Ophthalmol., Chicago, v.73, p.205-210, 1965.

ENGERMAN, R.L., BLOODWORTH, J.M.B., NELSON, J. Relationship of microvascular disease in diabetes to metabolic control. Diabetes, New York, v.26, p.760-769, 1977.

ENGERMAN, R., FINKESLSTEIN, D., AGUIRRA, G. et al. Ocular complications. Diabetes, New York, v.31, p.82-88, 1982.

FINE, B.S., ZIMMERMANN, L.E. Müller's cells and the "middle limiting membrane" of the human retina - an electron-microscopic study. Invest. Ophthalmol., St. Louis, v.1, p.304-326, 1962.

FISHER, R.F. Comparison of the size of pericytes of the retinal capillaries in the normal and diabetic state. Trans. Ophthalmol. Soc. U.K., London, v.100, p.90-93, 1980.

FISCHER, F., GARTNER, J. Morphometric analysis of basal laminae in rats with long term streptozotocin diabetes: vitreoretinal juncture. Exp. Eye Res.,

London, v.34, p.595-600, 1982.

FISCHER, F., GARTNER, J. Morphometric analysis of basal laminae in rats with long - term streptozotocin diabetes -Retinal capillaries. Exp. Eye Res., London, v.37, p.55-64, 1983.

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

FRIEDENWALD, J.S. Diabetic retinopathy. Am. J. Ophthalmol., Chicago, v.33, p.1187-1199, 1950.

GARRIS, D.R., WHITEHEAD, D.S., MORGAN, C.R. Effects of alloxan-induced diabetes on corpus luteum function in the pseudo- pregnant rat. Diabetes, New York, v.33, p.611-615, 1984.

GERMANO, G.A., CUNHA, M.A., CUNHA, R.A. et al. Causas de cegueira binocular no Instituto Penido Burnier nos anos 1940, 1960 e 1980. Arq. I. P. B., Campinas, v.27, p.19-21, 1985.

GLATT, H.J., HENKIND, P. Age changes in the retinal capillary bed of the rat. Microvasc. Res., v.18, p.1, 1979.

GORDON, S.R., ESSNER, E. Plasma membrane: associated vesicles in retinal capillaries of the rat. Am. J. Anat., New York, v.174, p.161-172, 1985.

GORDON, S.R., ESSNER, E. Actin, myosin and laminin localization in retinal

vessels of the rat. Cell Tissue Res., Berlin, v.244, p.583-589, 1986.

GRIMES, P.A. Fluorescein distribution in retinas of normal and diabetic rats. Exp. Eye Res., v.41, p.227-238, 1985.

GRIMES, P.A., LATIES, A.M. Early morphological alteration of pigmented epithelium in streptozotocin-induced diabetes-increased surface area of the basal cell membrane. Exp. Eye Res., London, v.30, p.631-639, 1980.

GRIMES, P.A., McGLINN, A., LATIES, A.M. et al. Increase of basal cell membrane area of the retinal pigment epithelium in experimental diabetes. Exp. Eye Res., London, v.38, p.569-577, 1984.

HEATH, H., RUTTER, A.C. Retinal angiopathy in alloxan - diabetic rats. Br. J. Exp. Pathol., Oxford, v.47, p.116-120, 1966.

HILLEBRAND, I., BOËHME, K., FRANK, G. et al. The effects of the beta-glucosidase inhibitor Bay g 5421 (Acarbose) on postprandial blood glucose, serum insulin, and triglyceride levels: dose-time-response relationships in man. Resp. Exp. Med., Berlin, v.175, p.87-94, 1979.

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

HOGAN, M.J., FEENEY, L. The ultrastructure of retinal vessels - the small vessels. J. Ultrastruct. Res., Duluth, v.9, p.29-46, 1963a.

- HOGAN, M.J., FEENEY, L. The ultrastructure of the retinal vessels-vascular glial relationships. J. Ultrastruct. Res., Duluth, v.9, p.47-64, 1963b.
- HOGAN, M.J., ALVARADO, J.A., WEDDELL, J.E. Retina. In:\_\_\_\_. Hystology of the human eye. Philadelphia: W.B. Saunders, 1971. cap.9, p.393-519.
- HORI, S., MUKAI, N. Ultrastructure lesions of pericapillary Müller cells in streptozotocin - induced diabetic rats. Albrecht. v. Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol., Heidelberg, v.213, p.1-9, 1980.
- HORI, S., NISHIDA, T.,MUKAI, N. Ultrastructural studies on lysosomes in retinal Müller cells of streptozotocin-diabetic rats. Invest. Ophthalmol., St. Louis, v.19, p.1295-1300, 1980.
- ISHIBASHI, I., TANAKA, K., TANIGUCHI, Y. Platelet aggregation and coagulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy in rats. Diabetes, New York, v.30, p.601-606, 1981.
- ISHIBASHI, T., SADAMI, I., TANAKA, K. Fibrinolytic activity of the retinal in streptozotocin-diabetic rats. Invest. Ophthalmol., v.26, p.125-127, 1985.
- ISHIKAWA, T. Fine structure of retinal vessels in man and macaque monkey. Invest. Ophthalmol., St. Louis, v.2, p.1-8, 1963.
- JENKINS, D.J., TAYLOR, R.H., ALBERTI, K.G. Combined use of guar and Acarbose in reduction of postprandial glycaemia. Lancet, London, v.2, p.924-

927, 1979.

JERNELD, B. Prevalence of diabetic retinopathy. Acta Ophthalmol. Suppl., Copenhagen, v.188, p.7-29, 1988.

JONASSON, O., JONES, C.W., BAUMAN, C. et al. The pathophysiology of experimental insulin - deficient diabetes in the monkey: implications for pancreatic transplantation. Ann. Surg., Philadelphia, v.201, p.27-39, 1985.

JUNOD, A., LAMBERT, A.E., ORCI, L. et al. Studies of diabetogenic action of streptozotocin. Proc. Soc. Exp. Biol., New York, v.126, p.201-205, 1967.

JUNOD, A., LAMBERT, A.E., STAUFFACHER, W. et al. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. J. Clin. Invest., New York, v.48, p.2129-2139, 1969.

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

KERNELL, A., ARNQVIST, H. Effect of insulin treatment on the blood-retinal barrier in rats with streptozocin - induced diabetes. Arch. Ophthalmol., Chicago, v.101, p.968-970, 1983.

KILO, C., VOGLER, N., WILLIAMSON, J.R. Muscle capillary basement membrane changes related to ageing and to diabetes mellitus. Diabetes, New York, v.21, p.881-905, 1972.

- KINOSHITA, J.H., NISHIMURA, C. The involvement of aldose reductase in diabetic complications. Diabetes Metab. Rev., New York, v.4, p.323-337, 1988.
- KISSEN, A.T., BLOODWORTH Jr., J.M.B. Ultrastructure of retinal capillaries of the rat. Exp. Eye Res., London, v.1, p.1-4, 1961.
- KOHNER, E.M., BARRY, P.J. Prevention of blindness in diabetic retinopathy. Diabetologia, Berlin, v.26, p.173-179, 1984.
- KOHNER, E.M., OAKLEY, N.W. Progress in endocrinology and metabolism. Metabolism, New York, v.24, p.1085-1102, 1975.
- KOJIMA, K., MAJIMA, Y., NIMI, K. et al. Light and electron microscopic studies on ocular tissues in streptozotocin - treated diabetic rats. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, Tokyo, v.76, p.1001-1016, 1972.
- KORTE, G.E., BELLHORN, R.W., BURNS, M.S. Remodelling of the retinal pigment epithelium in response to intraepithelial capillaries-evidence that capillaries influence the polarity of epithelium. Cell Tissue Res., Berlin, v.245, p.135-142, 1986.
- KRUPIN, T., WALTMAN, S.R., SCHARP, D.W. et al. Ocular fluorophotometry in streptozotocin diabetes mellitus in the rat - effect of pancreatic islet isografts. Invest. Ophthalmol., St. Louis, v.18, p.1185-1190, 1979.
- KUWABARA, T., COGAN, D.G. Studies of retinal vascular patterns-normal architecture. Arch. Ophthalmol., Chicago, v.64, p.904-911, 1960.

KUWABARA, T. & COGAN, D.G. Retinal glicogen. Arch. Ophthalmol., Chicago, v.66, p.96-104, 1961

KUWABARA, T., COGAN, D.G. Retinal vascular patterns: mural cells of the retinal capillaries. Arch. Ophthalmol., Chicago, v.65, p.114-124, 1963.

KUWABARA, T., COGAN, D.G. Retinal vascular patterns-acellular change. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., St. Louis, v.4, p.1049-1058, 1965.

LAI, Y.L. Outward movement of photoreceptor cells in normal rat retina. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., St. Louis, v.19, p.849-856, 1980.

LAVINSKY, J., CHOTGUES, M.L.F., FRANCO, J.A. Levantamento das causas de cegueira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PREVENÇÃO DA CEGUEIRA, 7, 1986, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: Livraria do Globo, 1986. p.49-95.

LAZAROW, A., PALAY, S.L. Production and course of alloxan diabetes in the rats. J. Lab. Clin. Med., St. Louis, v.31, p.1004-1015, 1946.

LEUENBERGER, P.M. Ultrastructure of the ageing retinal vascular system, with special reference to quantitative and qualitative changes of capillary basement membranes. Gerontologia, Basel, v.19, p.1-15, 1973.

LEUENBERGER, P.M., BABEL, J. Cellular and biochemical aspects of diabetic retinopathy. In: INERM SYMPOSIUM, 7, Amsterdam, 1978. Amsterdam:

Fregnault & Duhault, 1978.

LEUENBERGER, P.M., BABEL, J., FULL, C. Width of retinal capillary membrane of spiny mice (*Acomys cahirinus*) at various ages. Doc. Ophthalmol., Dordrecht, v.28, p.191-200, 1970.

LEUENBERGER, P.M., CAMERON, D., STAUFFACHER, W. et al. Ocular lesions in rats rendered chronically diabetic with streptozotocin. Ophthalmic Res., Basel, v.2, p.189-204, 1971.

LEUENBERGER, P.M., BEAUCHEMIN, M.L., BABEL, J. Experimental diabetic retinopathy. Arch. Ophthalmol., Paris, v.34, p.289-302, 1974.

LEVENE, R., LAZZARINI-ROBERTSON, A., FOGLIA, V.G. The retina in experimental diabetic rats. Arch. Ophthalmol., Chicago, v.70, p.253-255, 1963.

LIN, W.L., ESSNER, E. Diffuse cytoplasmic staining of retinal capillary endothelium. J. Histochem. Cytochem., Baltimore, v.34, p.1325-1330, 1986.

LUKENS, F.D.W. Alloxan diabetes. Physiol. Rev., Bethesda, v.28, p.304-330, 1948.

MACGREGOR, L.C., MATSCHINSKY, F.M. Experimental diabetes mellitus impairs the function of the retinal pigmented epithelium. Metabolism, New York, v.35, p.28-34, 1986 (suppl.).

MACMILLAN, D.E. Deterioration of the microcirculation in diabetes. Diabetes,

New York, v.24, p.944-957, 1975.

MAEDA, J. Electron microscopy of the retinal vessels - human retina. Jpn. J. Ophthalmol., Tokyo, v.3, p.37-47, 1959.

MERING, J.V., MINKOWSKI, O. Diabetes mellitus nach pankreasexstirpation. Arch.Exp. Pathol. Pharmacol., Heidelberg, v.26, p.371-387, 1889.

MITCHELL, P., MOFFITT, P. Update and implications from the Newcastle diabetic retinopathy study. Aust. N.Z.J. Ophthalmol., Sydney, v.18, p.13-17, 1990.

MORDES, J.P., ROSSINI, A.A. Animal models of diabetes. Am. J. Med., Newton, v.70, p.353-360, 1981.

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

MUKAI, N. Retinal changes in human cases of diabetes mellitus and alloxan-diabetic rats. Invest. Ophthalmol. vis Sci., St. Louis, v.10, p.163-164, 1971.

MUTLU, F., LEOPOLD, I.H. Structure of the retinal vascular system of the dog, monkey, rat, mouse and cow. Am. J. Ophthalmol., Chicago, v.58, p.261-270, 1964.

NAESER, P., ANDERSON, A. Effect of pancreatic islet implantation on the morphology of retinal capillaries in alloxan diabetic mice. Acta Ophthalmol.,

Copenhagen, v.61, p.38-44, 1983.

NAGATA, M., KATZ, M.L., ROBISON Jr., W.G. Age related thickening of retinal capillary basement membranes. Invest. Ophthalmol. vis Sci., St.Louis, v.27, p.437-440, 1986.

NAGATA, M., ROBISON Jr., W.G. Aldose reductase diabetes and thickening of the retinal inner limiting membrane. Invest. Ophthalmol. vis Sci., St. Louis, v.28, p.1867-1869, 1987.

NATIONAL COMMISSION ON DIABETES. Report to the Congress of the United States. The long range plan to combat diabetes. DHEW Publ., Washington, v.1, p.76-1028, 1976.

OAKLEY, N., HILL, D.W., JOPLIN, G.F. et al. Diabetic retinopathy: the assessment of severity and progress by comparison with a set of standard fundus photographs. Diabetologia, Berlin, v.3, p.402-405, 1967.

OLIVEIRA, F. Pericytes in diabetic retinopathy. Br. J.Ophthalmol., London, v.50, p.134-143, 1966.

OSTLE, B. Analisis de um diseño completamente azarizado que involucra combinaciones de tratamiento factorial. In:\_\_\_\_. Estadística aplicada. México: Limusa-Wiley, 1973. p.350-371.

PAPACHRISTODOULOU, D., HEATH, H., KANG, S.S. The development of retinopathy in sucrose fed and streptozotocin diabetic rats. Diabetologia, Berlin,

v.12, p.367-376, 1976.

PAPACHRISTODOULOU, D., HEATH, H. Ultrastructural alterations during development of retinopathy in sucrose - fed and streptozotocin-diabetic rats. Exp. Eye Res., London, v. 25, p. 371 - 384, 1977.

PENFIELD, W. Cytology and cellular pathology of the nervous system. New York: Hoeber, 1932. 421p.

POULIQUEN, Y. La retine. In:\_\_\_\_. Atlas d'histologie et d'ultras tructure du globe oculaire. Paris:Masson, 1969. cap.8, p.99-121.

RASCH, R. Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment. Diabetologia, Berlin, v.16, p.319-324, 1979.

RAVIOLA, G., BUTLER, J.M. Unidirectional vesicular transport mechanism in retinal capillares. Invest. Ophthalmol. Vis Sci., St. Louis, v.24, p.1465-1474, 1983.

RAVIOLA, G., BUTLER, J.M. Morphological evidence for the transfer of anionic macromolecules from the interior of the eye to the bloodstream. Curr. Eye Res., Oxford, v.4, p.503-516, 1985.

REDDI, A.S. Collagen metabolism in the retina of normal and diabetic rats. Exp. Eye Res., London, v.41, p.345-352, 1985.

ROBISON Jr.,W.G., KADOR,P.F., KINOSHITA,J.H. Retinal capillaries-basement

membrane thickening by galactosemia prevented with aldose reductase inhibitor. Science, Washington, v.221, p.4616-4618, 1983.

ROBISON Jr., W.G., KADOR, P.F., AKAGI, Y. et al. Prevention of basement membrane thickening in retinal capillaries by a novel inhibitor of aldose reductase tolrestat. Diabetes, New York, v.35, p.295-299, 1986.

ROBISON Jr., W.G., NAGATA, M., LAVER, N. et al. Aldose reductase and pericyte-endothelial cell junctions in retina and optic nerve. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., St. Louis, v.30, p.2293-2299, 1989.

ROBISON Jr., W.G., TILLIS, T.N., LAVER, N. et al. Diabetes - related histopathologies of the rat retina prevented with an aldose reductase inhibitor. Exp. Eye Res., London, v. 50, p. 355 - 366, 1990.

RODRIGUES,M., CURRIER,C., YOON,J. Electron microscopy of renal and ocular changes in virus - induced diabetes mellitus in mice. Diabetologia, Berlin, v.24, p.293-299, 1983.

ROSSI, G., HELDSTAB, A. Morphometric studies of pancreatic islets and retinal vessels of rats with streptozotocin - induced latent diabetes. Diabete Metab., Paris, v.7, p.77-86, 1981.

ROSSINI, A.A., LIKE, A.A., CHIK, W.L. Studies of streptozotocin-induced insulinitidis in diabetes. Proc. Nat. Acad. Sci, Washington, v.74, p.2485-2491, 1977.

SEBAG, J., McMEEL, J.W. Diabetic retinopathy -pathogenesis and the role of retina-derived growth factor in angiogenesis. Surv Ophthalmol, v.30, p.377-384, 1986.

SEGATO, T., MIDENA, E., GRIGOLETTO, F. et al. The epidemiology and prevalence of diabetic retinopathy in the Veneto region of north east Italy- Veneto Group for Diabetic Retinopathy. Diabetic Med., Chichester, v.8, p.11-16, 1991.

SIPERSTEIN, M.D. The relationship of carbohydrate derangements to the microangiopathy of Diabetes. In: CERASI, E., LUFT, R. Pathogenesis of diabetes mellitus - Symposium, 13, Stockolm, Almqvist & Wiksells, 1970, p.81-96.

SIPERSTEIN, M. Capillary basement membrane and diabetic microangiopathy. Adv. Intern. Med., Chicago, v.18, p.325-344, 1972.

SIPERSTEIN, M.D., UNGER, R.H., MADISON, L.L. Studies of muscle capillary basement membrane in normal subjects, diabetic and prediabetic patients. J. Clin. Invest., New York, v.47, p.1973-1999, 1968.

SIPERSTEIN, M.D., RASKIN, P., BURNS, H. Electron microscopic quantification of diabetic microangiopathy. Diabetes, New York, v.22, p.514-527, 1973.

SORSBY, A. Prevention of blindness - present prospects. Health Trends, London, v.5, p.7-15, 1973.

SOSULA, L. Capillary radius and wall thickness in normal and diabetic rat retinal. Microvasc. Res., New York, v.7, p.274-276, 1974.

SOSULA, L., BEAUMONT, P., JOHNSON, K.M. et al. Quantitative ultrastructure of capillaries in the rat retina. Invest. Ophthalmol. Vis Sci., St. Louis, v.11, p.916-925, 1972a.

SOSULA, L., BEAUMONT, P., HOLLOWES, F.G. et al. Dilatation and endothelial proliferation of retinal capillaries in streptozotocin-diabetic rats - quantitative electronmicroscopy. Invest. Ophthalmol. Vis Sci., St. Louis, v.11, p.926-935, 1972b.

SPADELLA, C.T. Avaliação funcional do transplante pancreato-duodenal no rato diabético. Botucatu: UNESP, 1989. 220p. Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 1989.

SPIRO, R.G. Investigations into the biochemical basis of diabetic basement-membrane alterations. Diabetes, New York, v.25, p.909-913, 1976. (suppl.)

TANIGUCHI, Y., NOMURA, T. Fine structure of retinal blood in human diabetics. Acta Soc. Ophthalmol. Jpn., Tokyo, v.72, p.1165-1178, 1968.

TILTON, R.G., LAROSE, L.S., WILLIAMSON, J.R. Absence of degenerative changes in retinal and uveal capillary pericytes in diabetic rats. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., St. Louis, v.27; p.716-721, 1986.

- TOUSSAINT, D., DUSTIN, P. Electronmicroscopy of normal and diabetic retinal capillaries. Arch. Ophthalmol., Chicago, v.70, p.96-108, 1963.
- TRAP-JENSEN, P. Increased capillary permeability to <sup>131</sup>iodine and <sup>51</sup>Cr EDTA in the exercising forearm of long - term diabetics. Clin. Sci., London, v.39, p.39-49, 1970.
- TSO, M.O.M., CUNHA-VAZ, J.G., SHIH, C.Y. et al. Clinicopathological study of blood - retinal barrier in experimental diabetes mellitus. Arch. Ophthalmol., Chicago, v.98, p.2032-2040, 1980.
- UEDA, T., LEE, S., STORCK, G. et al. Metabolic effect of alloxan diabetic rats before and after pancreas transplantation. Proc. Anat. Microsurg. Soc., v.3, p.423-424, 1979.
- ULSON, A.C.B., ABUJAMRA, S. Análise de 400 pacientes diabéticos portadores de retinopatia. Arq. Bras. Oftalmol., São Paulo, v.49, p.9-12, 1986.
- VINORES, S.A., CAMPOCHIARO, P.A., MAY, E.E. et al. Progressive ultrastructural damage and thickening of the basement membrane of the retinal pigment epithelium in spontaneously diabetic BB rats. Exp. Eye Res., London, v.46, p.545-558, 1988.
- VRACKO, R. Basal lamina layering in diabetes mellitus-evidence of accelerated rats of cell death and cell regeneration. Diabetes, New York, v.23, p.94-104, 1974.

- VRACKO, R., STRANDNESS, D.E. Basal lamina of abdominal skeletal muscle capillaries in diabetics and nondiabetics. *Circulation*, Dallas, v.41, p.271-283, 1967.
- WALLOW, I.H., ENGERMAN, R.L. Permeability and patency of retinal blood vessels in experimental diabetes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, St. Louis, v.16, p.447-449, 1977.
- WALTMAN, S., KRUPIN, T., HANISH, S. et al. Alteration of the blood - retinal barrier in experimental diabetes mellitus. *Arch. Ophthalmol.*, Chicago, v.96, p.878-879, 1978.
- WATANABE, R. Histological studies on diabetic rat retina induced by streptozotocin. *Acta Soc. Ophthalmol. Jpn.*, Tokyo, v.77, p.605-614, 1973.
- WEST, K.M., ERDREICH, L.J., STOBER, J.A. A detailed study of risk factors for retinopathy and nephropathy in diabetes. *Diabetes*, New York, v.29, p.501-507, 1980.
- WILLIAMSON, J.R., KILO, C. Basement membrane thickening and diabetic mystery. *Diabetes*, New York, v.18, p.925-927, 1969.
- WILLIAMSON, J.R., KILO, C. Basement membrane thickening and diabetic microangiopathy. *Diabetes*, New York, v.25, p.925-927, 1976.
- WILLIAMSON, J.R., KILO, C. Current status of capillary basement membrane disease in diabetes mellitus. *Diabetes*, New York, v.26, p.65-73, 1977.

WILLIAMSON, J.R., VOGLER, N.J., KILO, C. Estimation of vascular basement membrane thickness: theoretical and practical considerations. Diabetes, New York, v.18, p.567-577, 1969.

YANKO, L., MICHAELSON, I.C., COHEN, A.M. Retinopathy in rats with disturbed carbohydrate metabolism following a high sucrose diet. Am. J. Ophthalmol., Chicago, v.73, p.870-875, 1972.

YANOFF, M. Ocular pathology of diabetes mellitus. Am.J.Ophthalmol., Chicago, v.67, p.21-37, 1969.

YASUDA, H., HARANO, Y., KOSUGI, T. et al. Development of early lesions of microangiopathy in chronically diabetic monkeys. Diabetes, New York, v.33, p.415-420, 1984.

## 8 APÊNDICE

**TABELA 1:-** Média dos valores do peso (gr) dos ratos dos diferentes grupos experimentais, nos momentos de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO				
	M1	M2	M3	M4	M5
Controle (GC)	309,17b A	373,50b A	356,83b A	351,67b A	390,67b A
Diabético (GD)	207,83a A	194,83a A	215,50a A	258,50a A	255,17a A
Diabético Tratado(GT)	269,17ab A	332,67b A	286,50ab A	315,50ab A	320,67ab A

CV = 22,84%

DMS (5%) = 92,70 para grupo dentro de momento

DMS (5%) = 108,15 para momento dentro de grupo

**TABELA 2:-** Média dos valores da diurese (ml/24hs) dos ratos dos diferentes grupos experimentais, no dia do sacrifício.

GRUPO	MOMENTO				
	M1	M2	M3	M4	M5
Controle 10,67a (GC)	7,50a A	6,58a A	10,17a A		10,67a A
Diabético (GD)	54,67b AB	40,50b AB	37,50b A	62,83b B	56,67b B
Diabético 18,83a Tratado(GT)	25,67a A		26,33ab A	27,50ab A	30,67a A

CV = 53,06%

DMS (5%) = 20,71 para grupo dentro de momento

DMS (5%) = 24,16 para momento dentro de grupo

**TABELA 3-** Média dos valores de ingestão hídrica (ml/24hs) dos ratos dos diferentes grupos experimentais, no dia do sacrifício.

GRUPO	MOMENTO				
	M1	M2	M3	M4	M5
Controle 26,00a (GC)	31,33a A	27,83a A	41,83a A	31,17a A	A
Diabético (GD)	81,17b A	68,83ab A	72,67b A	82,50b A	92,00b A
Diabético Tratado(GT)	60,50b A	77,67b A	72,33b A	62,67b A	63,00b A

CV = 42,84%

DMS (5%) = 34,93 para grupo dentro de momento

DMS (5%) = 40,75 para momento dentro de grupo

**TABELA 4:-** Média dos valores da glicemia (mg%) dos ratos dos diferentes grupos experimentais, nos momentos de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO				
	M1	M2	M3	M4	M5
Controle (GC)	124,00a A	176,00a A	167,33a A	118,00a A	127,33a A
Diabético (GD)	353,83b A	404,83b A	448,50b A	314,50b A	355,50b A
Diabético Tratado(GT)	254,33ab A	294,67b A	201,50a A	258,67b A	205,00a A

CV = 33,11%

DMS (5%) = 115,19 para grupo dentro de momento

DMS (5%) = 134,39 para momento dentro de grupo

**TABELA 5:-** Média dos valores de glicose urinária (mg%) dos ratos dos diferentes grupos experimentais, nos momentos de saCrifício.

GRUPO	MOMENTO				
	M1	M2	M3	M4	M5
Controle (GC)	106,33a A	326,50a A	181,67a A	131,67a A	59,00a A
Diabético (GD)	5922,33b A	4610,50b A	5212,17b A	3384,83b A	4444,00b A
Diabético Tratado(GT)	4099,33b A	3651,83b A	3625,67b A	1842,00ab A	2970,33b A

CV = 62,94%

DMS (5%) = 2335,10 para grupo dentro de momento

DMS (5%) = 2724,29 para momento dentro de grupo

**TABELA 6:-** Área (um2) das células endoteliais de vasos da camada ganglionar dos ratos dos GC, GD e GT, no momento de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO				
	M1	M2	M3	M4	M5
Controle	67,92	93,07	68,16	64,86	83,87
	70,27	60,11	46,29	62,16	90,24
	65,26	81,48	77,33	58,23	63,54
	52,30	60,31	50,95	64,20	79,03
Diabético	61,90	93,20	70,59	52,25	67,22
	61,68	65,05	78,34	57,59	79,47
	60,10	65,54	86,86	90,26	93,99
	61,24	83,81	76,80	41,39	81,78
Diabético tratado	45,54	56,71	66,23	81,31	77,29
	93,02	45,64	65,37	65,65	57,85
	53,53	59,06	53,71	55,86	72,02
	60,69	53,80	69,65	69,74	66,03

**TABELA 7:-** Medidas descritivas da área das células endoteliais (um<sup>2</sup>) de vasos da camada ganglionar dos ratos dos GC,GD e GT, no momento de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO	ESTATÍSTICA DESCRITIVA				
		VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	VALOR MÉDIO	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
Controle	M1	52,30	70,27	63,94	8,02	12,54
	M2	60,11	93,07	73,74	16,33	22,14
	M3	46,29	77,33	60,68	14,55	23,98
	M4	58,23	64,86	62,36	2,99	4,79
	M5	63,54	90,24	79,17	11,39	14,39
Diabético	M1	60,10	61,90	61,23	0,80	1,31
	M2	65,05	93,20	76,90	13,94	18,13
	M3	70,59	86,86	78,15	6,71	8,59
	M4	41,39	90,26	60,37	21,03	34,83
	M5	67,22	93,99	80,61	10,97	13,61
Diabético tratado	M1	45,54	93,02	63,19	20,82	32,94
	M2	45,64	59,06	53,80	5,85	10,87
	M3	53,71	69,65	63,74	6,94	10,89
	M4	55,86	81,31	68,14	10,54	15,47
	M5	57,85	77,29	68,30	8,35	12,22

**TABELA 8:-** Área (um2) das células endoteliais de vasos da camada plexiforme externa dos ratos dos GC, GD e GT, no momento de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO	ESTATÍSTICA DESCRITIVA				
		VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	VALOR MÉDIO	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
Controle		61,69	53,77	83,55	41,51	68,66
		81,25	54,86	56,27	57,60	71,52
		72,01	60,44	68,07	75,33	60,55
		54,69	77,86	55,41	60,45	71,73
Diabético		71,76	118,66	92,32	61,13	77,11
		86,29	60,48	73,43	71,97	82,81
		57,32	75,20	47,87	52,77	47,95
		55,34	67,90	80,19	75,06	86,24
Diabético tratado		50,39	67,92	76,55	77,89	79,58
		21,85	60,03	71,40	55,07	61,90
		70,99	54,62	55,16	59,42	72,02
		90,87	60,86	65,71	81,97	59,63

**TABELA 9:-** Medidas descritivas da área das células endoteliais (um<sup>2</sup>) de vasos da camada plexiforme externa dos ratos dos GC, GD e GT, no momento de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO	ESTATÍSTICA DESCRITIVA				
		VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	VALOR MÉDIO	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
Controle	M1	54,69	81,25	67,41	11,65	17,28
	M2	53,77	77,86	61,73	11,14	18,05
	M3	55,41	83,55	65,82	13,15	19,97
	M4	41,51	75,33	58,72	13,86	23,60
	M5	60,55	71,73	68,11	5,23	7,68
Diabético	M1	55,34	86,29	67,68	14,41	21,29
	M2	60,48	118,66	80,56	26,10	32,40
	M3	47,87	92,32	73,45	18,76	25,54
	M4	52,77	75,06	65,23	10,23	15,68
	M5	47,95	86,24	73,53	17,46	23,74
Diabético tratado	M1	21,85	90,87	58,52	29,51	50,42
	M2	54,62	67,92	60,86	5,46	8,97
	M3	55,16	76,55	67,20	9,17	13,64
	M4	55,07	81,97	68,59	13,32	19,42
	M5	59,63	79,58	68,28	9,26	13,56

**TABELA 10:-** Área (um2) de pericitos dos vasos da camada ganglionar dos ratos dos GC, GD e GT, no momento de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO	ESTATÍSTICA DESCRITIVA				
		VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	VALOR MÉDIO	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
Controle		15,84	22,66	34,37	13,91	14,65
		29,18	26,12	18,38	17,28	24,82
		32,40	29,37	20,70	9,66	28,29
		17,17	13,77	12,42	15,26	28,74
Diabético		20,40	40,90	21,48	14,68	27,78
		11,06	17,89	24,12	17,78	15,09
		23,04	13,73	28,73	27,92	26,54
		14,76	24,37	14,15	27,50	18,45
Diabético tratado		19,50	9,61	11,76	23,22	13,35
		21,06	9,55	14,96	16,26	21,38
		17,82	9,13	7,77	13,49	25,14
		14,85	9,43	13,75	13,90	29,99

**TABELA 11:-** Medidas descritivas da área de pericitos (um<sup>2</sup>) dos vasos da camada ganglionar dos ratos dos GC, GD e GT, no momento de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO	ESTATÍSTICA DESCRITIVA				
		VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	VALOR MÉDIO	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
Controle	M1	15,84	32,40	23,65	8,37	35,39
	M2	13,77	29,37	22,98	6,72	29,24
	M3	12,42	34,37	21,47	9,28	43,23
	M4	9,66	17,28	14,03	3,22	22,95
	M5	14,65	28,74	24,12	6,56	27,19
Diabético	M1	11,06	23,04	17,31	5,41	31,23
	M2	13,73	40,90	24,22	11,95	49,34
	M3	14,15	28,73	22,12	6,10	27,58
	M4	14,68	27,92	21,97	6,75	30,72
	M5	15,09	27,78	21,96	6,17	28,08
Diabético tratado	M1	14,85	21,06	18,31	2,66	14,53
	M2	9,13	9,61	9,43	0,21	2,23
	M3	7,77	14,96	12,06	3,15	26,12
	M4	13,49	23,22	16,72	4,50	26,91
	M5	13,35	29,99	22,46	7,02	31,24

**TABELA 12:-** Área (um2) de pericitos dos vasos da camada plexiforme externa dos ratos dos GC, GD e GT, no momento de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO	ESTATÍSTICA DESCRITIVA				
		VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	VALOR MÉDIO	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
Controle		17,12	13,95	20,11	5,18	14,92
		14,09	16,93	19,84	8,08	9,59
		16,34	19,11	16,42	17,73	17,54
		9,90	10,81	12,75	18,20	19,63
Diabético		12,73	12,91	21,15	11,92	14,76
		12,07	12,59	11,43	45,02	16,81
		13,96	10,34	10,18	18,40	21,85
		18,09	15,01	17,42	15,20	24,43
Diabético tratado		12,04	7,76	11,54	34,25	17,78
		27,57	10,98	8,67	17,92	12,60
		19,42	11,73	6,88	17,99	25,14
		20,48	10,16	21,22	10,58	20,20

**TABELA 13:-** Medidas descritivas da área de pericitos (um<sup>2</sup>) dos vasos da camada plexiforme externa dos ratos dos GC, GD e GT, no momento de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO	ESTATÍSTICA DESCRITIVA				
		VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	VALOR MÉDIO	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
Controle	M1	9,90	17,12	14,36	3,24	22,56
	M2	10,81	19,11	15,20	3,61	23,75
	M3	12,75	20,11	17,28	3,46	20,02
	M4	5,18	18,20	12,30	6,65	54,06
	M5	9,59	19,63	15,42	4,34	28,14
Diabético	M1	12,07	18,09	14,21	2,70	19,00
	M2	10,34	15,01	12,71	1,91	15,03
	M3	10,18	21,15	15,04	5,15	34,22
	M4	11,92	45,02	22,63	15,16	66,96
	M5	14,76	24,43	19,46	4,45	22,87
Diabético tratado	M1	12,04	27,57	19,88	6,36	31,99
	M2	7,76	11,73	10,16	1,72	16,93
	M3	6,88	21,22	12,08	6,39	52,90
	M4	10,58	34,25	20,18	10,00	49,53
	M5	12,60	25,14	18,93	5,21	27,55

**TABELA 14:-** Área (um<sup>2</sup>) da membrana basal dos vasos da camada ganglionar dos ratos dos GC, GD e GT, no momento de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO	ESTATÍSTICA DESCRITIVA				
		VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	VALOR MÉDIO	DESVIO PADRÃO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)	
Controle		34,47	41,25	42,88	33,44	34,15
		28,92	38,71	38,79	34,13	43,00
		31,49	53,35	49,75	38,45	37,12
		34,42	36,89	51,15	49,25	52,95
Diabético		51,03	32,56	49,49	40,04	41,01
		33,58	38,73	52,15	47,13	55,86
		36,16	41,71	61,69	81,03	57,57
		45,64	53,16	45,74	35,02	53,05
Diabético tratado		32,64	26,68	46,39	59,73	49,69
		46,20	35,06	39,78	53,02	39,92
		32,45	39,09	37,26	45,78	53,54
		42,86	33,61	44,38	42,03	37,13

**TABELA 15:-** Medidas descritivas da área da membrana basal (um<sup>2</sup>) dos vasos da camada ganglionar dos ratos dos GC,GD e GT, no momento de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO	ESTATÍSTICA DESCRITIVA				
		VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	VALOR MÉDIO	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
Controle	M1	28,92	34,47	32,32	2,66	8,23
	M2	36,89	53,35	42,55	7,42	17,44
	M3	38,79	51,15	45,64	5,83	12,77
	M4	33,44	49,25	38,82	7,30	18,80
	M5	34,15	52,95	41,80	8,29	19,83
Diabético	M1	33,58	51,03	41,60	8,15	19,59
	M2	32,56	53,16	41,54	8,63	20,77
	M3	45,74	61,69	52,27	6,81	13,03
	M4	40,04	81,03	50,80	20,75	40,84
	M5	41,01	57,57	51,87	7,48	14,42
Diabético tratado	M1	32,45	46,20	38,54	7,05	18,29
	M2	26,68	39,09	33,61	5,17	15,38
	M3	37,26	46,39	41,95	4,18	9,96
	M4	42,03	59,73	50,14	7,85	15,66
	M5	37,13	53,54	45,07	7,80	17,31

**TABELA 16:-** Área (um<sup>2</sup>) da membrana basal dos vasos da camada plexiforme externa dos ratos dos GC, GD e GT, no momento de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO	ESTATÍSTICA DESCRITIVA				
		VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	VALOR MÉDIO	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIACÃO (%)
Controle		31,44	30,56	44,48	20,45	33,92
		42,48	29,21	37,25	28,90	34,20
		30,28	27,91	38,59	37,65	25,52
		28,86	35,72	35,66	29,45	41,80
Diabético		32,99	44,61	45,10	35,64	41,38
		32,48	25,64	37,86	45,26	44,11
		31,10	42,78	42,67	40,15	44,83
		39,33	42,60	57,53	38,07	60,77
Diabético tratado		36,82	28,13	31,78	38,67	32,18
		29,65	22,82	34,58	34,73	40,13
		31,12	28,52	26,35	27,90	53,54
		28,58	26,49	44,43	32,21	43,04

**TABELA 17:-** Medidas descritivas da área da membrana basal (um<sup>2</sup>) dos vasos da camada plexiforme externa dos ratos dos GC, GD e GT, no momento de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO	ESTATÍSTICA DESCRITIVA				
		VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	VALOR MÉDIO	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
Controle	M1	28,86	42,48	33,26	6,23	18,72
	M2	27,91	35,72	30,85	3,42	11,08
	M3	35,66	44,48	38,99	3,85	9,87
	M4	20,45	37,65	29,11	7,03	24,15
	M5	25,52	41,80	33,86	6,65	19,64
Diabético	M1	31,10	39,33	33,97	3,66	10,77
	M2	25,64	44,61	38,91	8,89	22,85
	M3	37,86	57,53	45,79	8,38	18,31
	M4	35,64	45,26	39,78	4,09	10,28
	M5	41,38	60,77	47,78	8,79	18,40
Diabético tratado	M1	28,58	36,82	31,54	3,67	11,64
	M2	22,82	28,52	26,49	2,60	9,81
	M3	26,35	44,43	34,28	7,58	22,10
	M4	27,90	38,67	33,38	4,52	13,53
	M5	32,18	53,54	42,22	8,83	20,91

**TABELA 18:-** Área (um<sup>2</sup>) do lúmen dos vasos da camada ganglionar de dos ratos dos GC, GD e GT, no momento de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO	ESTATÍSTICA DESCRITIVA				
		VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	VALOR MÉDIO	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
Controle		190,96	123,82	181,59	106,14	129,05
		107,53	164,64	104,51	176,48	207,23
		147,15	156,12	181,04	99,86	180,16
		112,83	133,27	183,79	173,48	160,95
Diabético		149,24	168,08	190,14	63,96	209,63
		143,23	110,53	146,75	123,88	132,18
		55,28	177,69	102,78	201,61	189,91
		165,28	82,18	111,08	100,08	208,90
Diabético tratado		72,02	121,77	142,10	210,04	184,59
		139,00	148,08	115,98	116,73	142,40
		74,00	111,27	129,76	84,11	165,24
		111,33	127,04	145,30	153,43	149,03

**TABELA 19:-** Medidas descritivas da área do lúmen vascular (um<sup>2</sup>) dos vasos da camada ganglionar dos ratos dos GC, GD e GT, no momento de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO	ESTATÍSTICA DESCRITIVA				
		VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	VALOR MÉDIO	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
Controle	M1	107,53	190,96	139,62	38,47	27,55
	M2	123,82	164,64	144,46	19,10	13,22
	M3	104,51	183,79	162,73	38,83	23,86
	M4	99,86	176,48	138,99	41,65	29,97
	M5	129,05	207,23	169,35	32,90	19,43
Diabético	M1	55,28	165,28	128,26	49,53	38,62
	M2	82,18	177,69	134,62	45,84	34,05
	M3	102,78	190,14	137,69	39,83	28,93
	M4	63,96	201,61	122,38	58,28	47,62
	M5	132,18	209,63	185,16	36,48	19,70
Diabético tratado	M1	72,02	139,00	99,09	32,17	32,46
	M2	111,27	148,08	127,04	15,48	12,18
	M3	115,98	145,30	133,28	13,34	10,01
	M4	84,11	210,04	141,08	53,99	38,27
	M5	142,40	184,59	160,31	18,81	11,73

**TABELA 20:-** Área (um2) do lúmen dos vasos da camada plexiforme externa dos ratos dos GC, GD e GT, no momento de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO	ESTATÍSTICA DESCRITIVA				
		VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	VALOR MÉDIO	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
Controle		173,90	97,39	205,15	86,23	179,00
		157,87	106,67	143,99	86,20	102,68
		105,09	143,48	57,87	143,60	123,32
		144,72	165,28	108,97	137,50	139,07
Diabético		95,21	181,42	151,07	104,63	197,17
		176,93	134,60	96,76	146,71	124,12
		104,35	148,24	55,63	64,40	159,32
		151,40	113,50	143,54	157,23	230,66
Diabético tratado		80,66	110,16	111,57	147,97	107,69
		145,68	92,30	78,29	81,68	164,04
		128,33	121,41	103,81	111,19	165,24
		93,55	107,96	145,98	181,97	67,67

**TABELA 21:-** Medidas descritivas da área do lúmen vascular (um<sup>2</sup>) dos vasos da camada plexiforme externa dos ratos dos GC, GD e GT, no momento de sacrifício.

GRUPO	MOMENTO	ESTATÍSTICA DESCRITIVA				
		VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	VALOR MÉDIO	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
Controle	M1	105,09	173,90	145,39	29,40	20,22
	M2	97,39	165,28	128,20	31,73	24,75
	M3	57,87	205,15	128,99	61,87	47,96
	M4	86,20	143,60	113,38	31,47	27,76
	M5	102,68	179,00	136,02	32,30	23,75
Diabético	M1	91,21	176,93	130,22	40,77	31,31
	M2	113,50	181,42	144,44	28,50	19,73
	M3	55,63	151,07	111,75	44,46	39,78
	M4	64,40	157,23	118,24	42,48	35,93
	M5	124,12	230,66	177,82	46,16	25,96
Diabético tratado	M1	80,66	145,68	112,05	30,13	26,89
	M2	92,30	121,41	107,96	11,99	11,10
	M3	78,29	145,98	109,91	27,93	25,41
	M4	81,68	181,97	130,70	43,63	33,38
	M5	67,67	165,24	126,16	47,34	37,52