Luís Carlos Martins

Avaliação ultra-estrutural do endotélio corneal de ratos normais e de diabéticos aloxânicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Área de Concentração em Bases Gerais da Cirurgia, da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof[a] Adjunta Silvana Artioli Schellini

BOTUCATU – SP

2002

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SULAMITA SELMA CLEMENTE COLNAGO

Martins, Luís Carlos.
Avaliação ultra-estrutural do endotélio corneal de ratos normais e diabéticos aloxânicos / Luís Carlos Martins. – 2002.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2002.
Orientador: Silvana Artioli Schellini

1. Córnea – Ultra-estrutura – Estudos experimentais.

CDD 617.719

Palavras-chave: Ratos, Diabetes mellitus experimental; Córnea; Ultra-estrutura; Endotélio; Ultra-estrutura;

Dedicatória

A Deus

Aos meus Pais, Antônio e Celina pela oportunidade da vida.

Aos meus filhos Gabriel e Brunno.

A Meyre minha esposa pelo apoio e carinho de sempre.

A todos os meus amigos e orientadores desta atual existência…

Agradecimentos

Agradecimentos

À Profa. Dra. Elisa Aparecida Gregório do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, pela incansável e eficiente orientação nas várias análises dos resultados ultra-estruturais.

Ao Prof. Carlos Roberto Padovani do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, pela execução e orientação da análise estatística.

Ao Prof. Dr. César Tadeu Spadella pela oportunidade de participar do grupo de estudos do Diabetes Experimental.

Ao Prof. Dr. Arthur Roquete de Macedo, criador do grupo de estudos de Diabetes Experimental da UNESP de Botucatu.

À Profa. Dra. Teresa Cristina França Sartori chefe da disciplina de histologia da Faculdade de Medicina de Marilia.

Ao Prof. Dr. Rinaldo Henrique Aguilar da Silva chefe da Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Marilia.

Ao Prof. Dr. João Batista Ernesto de Moraes pela revisão ortográfica da dissertação.

Aos funcionários do Laboratório de Microscopia Eletrônica Maria Helena Moreno, Maria Euleda Lino Perez e Nivalde Antônio Basso, pelo auxílio e apoio nas micrografias e exame ultra-estrutural.

Aos funcionários do setor de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu: Vera Lucia Aparecida Mengue, Lílian Cristina N. B. Nunes, Regina Célia Spadim, Nathanael Pinheiro Sales e Adinice Ruiz Pedro, pela orientação, presteza, educação e incentivo em todos os momentos.

À bibliotecária Sra. Sulamita Selma Clemente Colnago pelo auxílio na ficha catalográfica. UNESP-BOTUCATU.

As bibliotecárias Sra. Helena Maria da Costa Lima e Josefina Barbosa de Faria da Faculdade de Medicina de Marilia.

À Profª e tradutora Srª Norma Silva Bombini pela revisão do “Abstract”.

Aos funcionários do Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Elizete Simião e Silvia Helena Batista e à srtª Flavia Oliveira, pela solicitude de sempre.

Aos amigos Cristiano Augusto Sant´Ana, Rafael Vicente Mauad Armentano e Sidnei Piacente Doretto pelo auxílio em todos os momentos.

A senhora Maria Zenaide Topazzo.

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

Agradecimento especial

Agradecimento especial

Ao Prof. Dr. José Augusto Alves Ottaiano, pelas oportunidades desde o início da minha formação profissional na área de Oftalmologia e, posteriormente, na vida acadêmica. Pelo estímulo e apoio, pela orientação e exemplo, lhe sou eternamente grato.

Homenagem

Homenagem

A Prof[a] Adjunta Silvana Artioli Schellini, minha orientadora. Pela dedicação e paciência, pelo estimulo e pela orientação de sempre, meu muito obrigado.

Pelo ser humano que você é, sem o teu auxilio e orientação esta obra não teria sido concretizada.

Epígrafe

Epígrafe

Conhecereis a verdade e a verdade vos libertará…

Jesus

Sumário

Sumário

Dedicatória II
Agradecimentos IV
Agradecimento Especial VIII
Homenagem X
Epígrafe XII
Sumário XIV
Lista de Símbolos e Abreviaturas XVII
Lista de Tabelas XXI
Lista de Figuras XXIII
Resumo XXV

INTRODUÇÃO 01
1. Definição 02
2. Histórico 02
3. Epidemiologia 07
4. Diagnóstico 09
   4.1. Classificação 09
5. Diabetes – Fisiopatologia e manifestação sistêmica 11
6. Diabetes – Alterações Oftalmológicas 15
7. A Córnea e o Diabetes 21
   7.1. Anatomia Macroscópica e Microscópica 21
   7.2. Aspectos fisiológicos da córnea 23
      7.2.1. Metabolismo 24
      7.2.2. Controle de hidratação e transparência 25
   7.3. Córnea e Alterações Diabéticas 26
      7.3.1. Endotélio Corneal e diabetes 28
8. Justificativa da proposta 33

OBJETIVO 34

MATERIAL E MÉTODO 36
1. Animais utilizados 37
2. Grupos Experimentais 38
3. Momentos Experimentais 38
4. Parâmetros Estudados 40
   4.1 Parâmetros clínicos 40
   4.2 Parâmetros bioquímicos 40
   4.3 Parâmetros morfológicos 40
5. Seqüência dos tempos experimentais 41

6. Técnicas utilizadas 41
6.1 Indução do diabetes experimental 41
6.2 Manutenção dos animais 43
6.3 Coleta de material para os dados clínico-laboratoriais 43
6.4 Exames bioquímicos 44
6.5 Sacrifício dos animais 45
6.6 Preparo dos olhos para o exame morfológico 45
6.7 Documentação fotográfica 47
6.8 Análise estatística 47
RESULTADOS 49
1. Parâmetros clínicos 50
1.1. Observação clínica 50
1.1.1. Grupo Controle 50
1.1.2. Grupo Diabético 50
1.2. Avaliação do peso corporal 52
1.3. Avaliação da diurese 53
1.4. Avaliação da ingestão hídrica 54
2. Parâmetros bioquímicos 55
2.1. Glicemia 55
2.2. Glicose urinária 56
3. Parâmetros morfológicos 57
3.1. GC M2 57
3.2. GC M3 59
3.3. GD M2 60
3.4. GD M3 61
4. Legenda das Figuras 63
DISCUSSÃO 71
1. Quanto ao modelo experimental utilizado 72
2. Quanto aos resultados obtidos 77
2.1. Avaliação clinica laboratorial 77
2.2. Avaliação dos parâmetros clínicos 77
2.3. Avaliação dos parâmetros bioquímicos 79
3. Quanto a avaliação morfológica 80
CONCLUSÕES 90
REFERÊNCIAS 92
ABSTRACT 107
APÊNDICE 109

Lista de símbolos e abreviaturas

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ADA	American Diabetes Association
AGES	Produtos de glicolisação
ALAD	Associação Latino Americana de Diabetes
ATPase	Adenosinotrifosfatase
aC.	Antes de Cristo
ºC	Graus Celsius
CT-112	Nome fantasia de aldose inibidor de redutase
DM	Diabetes Mellitus
dC.	Depois de Cristo
GC	Grupo Controle
GCM0	Grupo Controle no Momento M0
GCM1	Grupo Controle no Momento M1
GCM2	Grupo Controle no Momento M2
GCM3	Grupo Controle no Momento M3
GD	Grupo Diabético
GDM0	Grupo Diabético no Momento M0
GDM1	Grupo Diabético no Momento M1
GDM2	Grupo Diabético no Momento M2
GDM3	Grupo Diabético no Momento M3
GPAA	Glaucoma primário de ângulo aberto

g	Grama (s)
HLA	Antígeno de Histocompatibilidade
h	Hora (s)
IRMAS	Anormalidade microvascular intra-retiniana (*Intraretinal microvascular abnormalities*)
K	Potássio
Kg	Quilograma (s)
M	Molaridade
M0	Dia do sorteio dos ratos para os respectivos grupos, coincidindo com o dia da indução do diabetes nos animais do grupo diabético.
M1	Dia do início do seguimento dos animais, o que ocorreu 15 dias após M0.
M2	1 mês após M0 ou sacrifício de animais dos grupos de estudo, 30 dias após M0.
M3	12 meses após M0 ou sacrifício de animais dos grupos de estudo, 12 meses após M0.
mg%	Miligrama (s) por cento
mg/dl	Miligrama(s) por decilitro.
ml	Mililitros (s).
mm	Milímetro (s).
mm²	Milímetro ao quadrado.
Na	Sódio.

µ	Micron.
PIO	Pressão intra-ocular.
pH	Logaritmo decimal do inverso da atividade dos íons hidrogênio em uma solução.
TTOG	Teste de tolerância oral de glicose.

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

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

TABELA 2 – Mediana e semi-amplitude total dos valores de diurese (ml/24h) dos grupos experimentais, nos momentos de sacrifício e respectivos resultados do teste estatístico.

TABELA 3 – Média e desvio padrão dos valores de ingestão hídrica (ml/24h) dos grupos experimentais, nos momentos de sacrifício e respectivos resultados do teste estatístico.

TABELA 4 – Mediana e semi-amplitude total dos valores da glicemia (mg%) dos grupos experimentais, nos momentos de sacrifício e respectivos resultados do teste estatístico.

TABELA 5 – Mediana e semi-amplitude total dos valores de glicose urinária (mg%) dos grupos experimentais, nos momentos de sacrifício e respectivos resultados do teste estatístico.

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS 1 a 8: Ultra-estrutura de endotélio do GC M2 (microscopia eletrônica de transmissão).

FIGURAS 9 a 12: Ultra-estrutura do endotélio do GC M3 (microscopia eletrônica de transmissão).

FIGURAS 13 a 24: Ultra-estrutura do endotélio do GD M2 (microscopia eletrônica de transmissão).

FIGURAS 25 a 36: Ultra-estrutura do endotélio do GD M3 (microscopia eletrônica de transmissão).

RESUMO

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a influência do diabetes experimental sobre a ultra-estrutura do endotélio corneal de ratos.

O estudo foi prospectivo, utilizando 20 ratos da raça Wistar, com 3 meses de idade, divididos em: grupo controle (GC), contendo 10 ratos, e grupo diabético (GD), contendo 10 ratos. A indução do diabetes foi feita com injeção de Aloxana endovenosa 42 mg/kg de peso (M0), após o que os animais foram observados por 15 dias para confirmar a presença de diabetes grave (M1). Um mês após M1 (M2) e 12 meses após M1 (M3) os animais foram sacrificados, sendo removidos e preparados os olhos para avaliação à microscopia eletrônica de transmissão.

Os animais do GD mostraram importante redução de peso, aumento da injestão hídrica e aumento da diurese em relação aos ratos do GC. Na avaliação morfológica observou-se nos animais do GC corpos densos e figuras de Mielina no M3. Os ratos do GD apresentaram as mesmas alterações encontradas no GC em M3, em maior intensidade, com alterações nucleares e citoplasmáticas, como mitocôndrias bastante alteradas na forma e tamanho, rarefação do citoplasma e aumento de vesículas. Os ratos do GD em M3 apresentaram mais alterações que os do GDM2. Conclui-se que o diabetes experimental causa dano ultra-estrutural no endotélio corneal de ratos e que as alterações são evolutivas.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. DEFINIÇÃO

O Diabetes é um distúrbio crônico, caracterizado por alteração no metabolismo da glicose e outras substâncias produtoras de energia, resultando tardiamente em complicações vasculares e neuropáticas; na realidade, trata-se de um grupo de distúrbios envolvendo diferentes mecanismos patogênicos, todos levando a um quadro de hiperglicemia (SHERWIN, 2000).

Seja qual for a sua etiologia, o diabetes está associado a deficiência total, parcial ou relativa de insulina. A falta de insulina desempenha papel fundamental nas alterações metabólicas associadas ao diabetes e hiperglicemia, que, por sua vez, desempenha papel chave nas complicações da doença (SHERWIN, 2000).

2. HISTÓRICO

O diabetes é uma doença antiga, havendo relatos históricos sobre sua existência desde muito antes da era Cristã. Alguns fatos de

importância constituem marcos durante o progresso das observações clínicas e das pesquisas em torno desta doença.

Arduino (1962), apresentou alguns destes marcos, descritos a seguir:

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

- Celsus, médico romano (30 aC – 50 da era Cristã (dC)), descreveu o diabetes como sendo “poliúria indolor, mas com emaciação e perigo”.

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

- Os hindus (século VI dC) descreveram em detalhes alguns sintomas da doença, assinalando pela primeira vez o gosto adocicado da urina, dando o nome “Madhumeda” (urina doce), pelo qual era conhecido.

- Avicena (980 – 1027 dC), grande médico árabe, forneceu excelente descrição do diabetes, registrando a perda das funções sexuais como um de seus sintomas. Acreditava que fosse o fígado, o órgão

comprometido no diabetes e acrescentou o furúnculo e a tuberculose como complicações freqüentes da enfermidade, fazendo, ainda, menção à gangrena diabética e ao sabor adocicado da urina.

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

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

- A relação causal entre o diabetes e o pâncreas foi verificada pela primeira vez por Cawley, em 1788 dC, ao observar a destruição do pâncreas em autópsia de indivíduo diabético.

- Culler (1709 – 1790 dC), acrescentou ao termo Diabetes, o adjetivo Mellitus, a fim de distinguir a doença do Diabetes Insipidus.

- Dobson (1776 dC) constatou que o sangue dos diabéticos é adocicado e que a urina tem açúcar fermentável.

- Rollo (1796 dC) foi o primeiro médico a propor a restrição dietética no tratamento do diabetes, relacionando também o hálito cetônico com a doença.

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

- Bouchardat (1806 – 1886 dC) utilizou-se dos métodos de fermentação do cobre, para a pesquisa da glicose na urina. Valorizou a dieta no tratamento do diabetes, restringindo os carboidratos e

aconselhando substituí-los por gordura, álcool e vegetais verdes. Recomendava, além disso, os dias de jejum.

- Claude Bernard (1813 – 1878 dC) descobriu a função glicogênica do fígado, considerando o glicogênio uma secreção interna. Acreditava ser o diabetes decorrente do excesso de produção de açúcar por aquele órgão, apontando, ainda, para a importância do sistema nervoso na regulação da glicemia.

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

- A cetona foi identificada na urina em 1857, por Petter´s, num portador de coma diabético, sendo sua presença no sangue registrada por Kussmaul, em 1874 dC.

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

- Naunyn (1886 dC) criou a expressão “acidose”, para designar a invasão do organismo por corpos cetônicos.

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

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

- Defendendo a idéia de que o princípio secretado pelas ilhotas de Langerhans poderia ser destruído pela secreção externa do pâncreas, após exaustivos experimentos realizados no laboratório de MacLeod (Toronto), Banting, em colaboração com Best, Mac Leod e Collip (1922 dC), descobriu e isolou a isletina, conhecida hoje como insulina. Esses cientistas comprovaram que a injeção desse hormônio diminui a glicemia de cães pancreatectomizados, melhorando dramaticamente os sintomas da doença (Arduino, 1962).

Em 11 de janeiro de 1922, a primeira injeção de insulina foi aplicada no homem. A descoberta da insulina constitui o marco culminante da história do diabetes e a maior conquista no campo do tratamento da doença. A descoberta da insulina valeu a Banting, o Prêmio Nobel de Medicina (Arduino, 1962).

Dunn et al. (1943), provocaram Diabetes em animais pela injeção de aloxana, substância que destrói especificamente as células beta do pâncreas.

Krayenbuhl & Rosemberg obtiveram, em 1946, a insulina NPH, o que representou considerável progresso na terapêutica da doença (Arduino, 1962).

Macedo et al. (1986) desenvolveram um grupo de estudo do diabetes experimental e que atualmente e coordenado pelo Dr. César Tadeu Spadella, na Faculdade de Medicina de Botucatu.

3. EPIDEMIOLOGIA

A incidência do diabetes varia na população mundial. Estima-se que aproximadamente 35 milhões de indivíduos estão envolvidos com a doença diabética (ALAD, 2000a).

É uma das principais causas de morte, de invalidez e cegueira entre 20 e 74 anos nos Estados Unidos da América (Harris et al., 1987).

Afeta homens e mulheres; de todas as idades. Estima-se que afete de 8 a 16 milhões de pessoas com prevalência de 10% nas pessoas acima de 60 anos, aumentando para cerca de 16 a 20% na população com mais de 80 anos de idade (Wilson et al., 1986). Segundo dados recentes, a prevalência de diabetes tipo 2 em menores de 30 anos é de 5% e após 60 anos sobe para 20% (ALAD, 2000a).

A prevalência da doença nas zonas urbanas oscila entre 7 a 8% e nas zonas rurais apenas 1 a 2%, sugerindo a influência do hábito de vida no desenvolvimento da doença (ALAD, 2000a).

O aumento da expectativa de vida contribui para o aumento do número de casos de diabetes (ALAD, 2000a).

Bastante grave é o fato de que 50% dos diabéticos ignoram que são portadores da doença (Wilson et al., 1986). Confirmando esta assertiva, segundo uma pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde, com auxílio da Sociedade Brasileira de Diabetes, no ano de 1998 existiam

no Brasil 7 milhões de portadores de diabetes, dos quais metade desconhecia o diagnóstico, ou seja, a doença freqüentemente é diagnosticada pelo aparecimento de uma de suas complicações (ALAD, 2000a).

Apesar da dificuldade de se obter estatísticas nacionais, estima-se que a prevalência de diabetes no Brasil seja de 7%, sendo maior na cidade de São Paulo, onde chega a 9,7% na faixa etária de 30 a 69 anos e 13,4%, na faixa etária de 60 a 69 anos, sendo semelhante a prevalência observada em vários paises desenvolvidos (Malerbi & Franco, 1992).

4. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da doença diabética é realizado quando a concentração de glicose plasmática de jejum ultrapassa 125mg/dl, em mais de uma ocasião (sem a presença de outros fatores como gravidez ou estresse que elevam a glicose plasmática), o que deve ser confirmado com um novo teste após o jejum de 8 a 10 horas. O teste de tolerância oral a glicose (TTOG) está indicado para pacientes em que a glicose de jejum se apresenta entre 110mg/dl e 125mg/dl. Os valores do TTOG que confirmam o diabetes são maiores que 200mg/dl, sendo denominados “Intolerância a Glicose”, os casos situados entre 140mg/dl e limite máximo de normalidade, 200mg/dl (Alberti & Zimmet, 1998; ADA The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2001).

4.1. CLASSIFICAÇÃO

Segundo recomendações da “American Diabetes Association” (ADA), a classificação da doença deve ser baseada na etiopatogenia e não mais na forma de tratamento, sendo o termo diabetes insulino-dependente e diabetes insulino-independente abolidos e os algarismos romanos I e II, substituídos pelos arábicos 1 e 2 (Albert &

Zimment, 1998; The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2001).

A Associação Americana de Diabetes classifica o diabetes em quatro grupos: tipo 1, tipo 2, outros tipos específicos e gestacional (American Diabetes Association, 1997).

Diabetes “tipo 1” representa cerca de 9% dos casos de diabetes, caracterizado pela destruição das células betas das ilhotas de pancreáticas, ocasionando uma deficiência absoluta de insulina. Este tipo de diabetes está associado a certos tipos de antígenos de histocompatibilidade (HLA) no cromossomo 6, com auto-imunidade dirigida contra as ilhotas e, possivelmente, com predisposição a infecção virótica. Ocorre principalmente na infância e adolescência. Este tipo de diabetes se não tratado adequadamente, evolui para cetoacidose diabética, coma diabético e morte. Retinopatia (16 a 21%), nefropatia (12 a 23%) e neuropatia (25 a 40%), são as complicações mais freqüentes (Foster, 1998; Nelson & Martyn, 1998; Sherwin 2000; ALAD, 2000b).

Diabetes “tipo 2” é o tipo mais comum, compreendendo cerca de 80 a 90% de todos os casos de diabetes. Surge após os 45 anos de idade. Auto-imunidade não é demonstrável, sendo que a prevalência de anticorpos antiilhotas é baixa e não existe correlação com antígeno do sistema HLA. É freqüentemente associado a obesidade e hereditariedade. Pode ser assintomático no início e o diagnóstico se estabelece pela dosagem da glicemia. É fortemente associado com

doenças cardiovasculares e hipertensão. Os pacientes com este tipo de diabetes apresentam resistência tecidual à insulina e liberação de insulina progressivamente diminuída (Foster, 1998; Sherwin, 2000).

Na categoria “outros tipos específicos de diabetes”, estão incluídas alterações decorrentes de defeitos genéticos, endocrinopatias (Cushing e Acromegalia), doenças do pâncreas e uso de drogas diabetogênicas (Sherwin, 2000).

O primeiro evento patogênico do diabetes é a deficiência herdada no mecanismo da secreção de insulina pela célula beta pancreática. Certos fatores adquiridos contribuem para aumentar a necessidade de insulina, constituindo-se em elementos predisponentes a obesidade e a gravidez (Foster, 1998; Sherwin, 2000).

O diabetes gestacional é definido como a intolerância aos carboidratos de severidade variável que se inicia, ou é primeiramente reconhecida, durante a primeira gestação. Ocorre em 1 a 3% de todas as gestações. A grávida obesa, com história familiar de diabetes, está especialmente propensa a exibir a doença (Sherwin, 2000; ADA, 2001b).

5. DIABETES - FISIOPATOLOGIA E MANIFESTAÇÃO SISTÊMICA

A falta relativa ou absoluta da secreção de insulina, associada ao excesso de hormônios do estresse circulantes, incluindo

glucagon, cortisol e catecolaminas, são responsáveis pelas elevações inapropriadas da glicose sanguínea e alterações do metabolismo lípidico, caracterizando a “síndrome metabólica”. Dentre as complicações agudas, decorrentes da descompensação metabólica, estão a cetoacidose, a hipoglicemia e o estado hiperosmolar não cetótico (Felig & Bergman, 1998; Sherwim, 2000).

No diabetes tipo 1, o nível de insulina circulante é praticamente não detectável, o glucagon plasmático é elevado e as células beta não respondem aos estímulos insulinogênicos. Os pacientes diabéticos tipo 1, em geral, apresentam poliúria, devido ao efeito diurético osmótico da glicose, polidipsia, perda de peso e polifagia que ocorrem a partir de níveis glicêmicos superiores a 200mg/dl. A ação inadequada da insulina leva a hiperglicemia e produção de corpos cetônicos (Foster 1998; Nelson & Martyn 1998; Sherwin, 2000).

A cetoacidase diabética ocorre em diabéticos tipo 1, devido a falta de insulina e a elevação de hormônios antagônicos, que provocam lipólise e liberação de corpos cetônicos. O principal fator desencadeante é o estresse orgânico, geralmente decorrente de doenças infecciosas, traumatismos, procedimentos cirúrgicos, falta de insulina ou não uso deste medicamento (Sherwin, 2000; ADA, 2001c).

O estado hiperglicêmico, ou hiperosmolar não cetótico, ocorre na deficiência da insulina e disfunção renal, mais em idosos e

pacientes levemente obesos. A hiperglicemia severa desencadeia diurese osmótica e desidratação acentuada (Sherwim, 2000; ADA, 2001c).

A hipoglicemia é outra complicação aguda importante em diabético tipo 1; pode ser decorrente da baixa ingestão alimentar e/ou uso excessivo de insulina (Foster, 1998; Sherwin, 2000).

O diabetes tipo 2 apresenta níveis glicêmicos situados entre a normalidade e a faixa diabética. A evolução é lenta, muitas vezes assintomática. A hiperglicemia, causa alterações funcionais muito antes que o diagnóstico seja estabelecido. Alterações metabólicas, decorrentes da hiperglicemia, são responsáveis pelo espessamento da membrana basal capilar, com inadequado fluxo sanguíneo em certas regiões críticas do organismo, levando a macroangiopatia e microangiopatia (Nelson & Martyn, 1998; Foster, 1998 e Sherwin, 2000).

A macroangiopatia diabética é caracterizada por aterosclerose da íntima e calcificação na camada média da parede arterial, predispondo a maior adesividade plaquetária. Dentre as complicações macroangiopáticas, estão as doenças arteriais coronarianas, vasculares periféricas e cérebro-vasculares. A prevalência de infarto agudo do miocárdio e doenças cérebro-vasculares é o dobro em diabéticos, quando comparada aos não diabéticos. Doenças vasculares periféricas (pé diabético) são causa de amputação de pernas e pés em pacientes diabéticos três vezes mais, quando comparados a indivíduos não diabéticos (Saudek; 1988; Foster 1998; Sherwin 2000).

A microangiopatia reflete anormalidade na lâmina basal (membrana basal), caracterizada por camadas adicionais e, conseqüentemente, aumento da espessura laminar. Clinicamente, os sítios mais importantes de envolvimento são a retina, glomérulos renais e nervos periféricos (Saudek, 1988; Foster 1998; Sherwin, 2000).

A neuropatia diabética é desencadeada por lesão segmentar de nervos, associada a desmielinização e degeneração de células de Schwann, envolvendo nervos periféricos sensitivos e motores. Os nervos afetados mostram espessamento da lamina basal, semelhante as anormalidades capilares. Acomete 80% a 100% dos pacientes que apresentam alterações sensoriais, como perda da sensibilidade dolorosa e térmica (Sherwin, 2000; ADA, 2001a).

A nefropatia diabética ocorre devido ao espessamento da membrana basal dos capilares e dos glomérulos; é também devida aos depósitos de glicoproteínas no mesângio, levando a nefroesclerose (Foster, 1998; Sherwin, 2000). O sinal mais precoce é a perda, acima dos valores normais, de proteínas na urina (micro-albuminúria). Ocorre em 20% dos pacientes diabéticos tipo 2 e em 40% dos do tipo 1 e é a principal causa de insuficiência renal, sendo responsável por cerca de 26% dos pacientes que ingressam em programas de diálise (Saudek, 1988; Foster, 1998; Sherwin, 2000).

6. DIABETES - ALTERAÇÕES OFTALMOLÓGICAS

Todos os componentes do sistema visual são susceptíveis a alterações relacionadas ao diabetes, envolvendo desde alterações refracionais, até lesões anatômicas e funcionais progressivas do olho e anexos, incluindo músculos extra-oculares, órbita, nervo óptico, coróide, retina, corpo ciliar, cristalino, íris e córnea. Estas alterações podem levar a cegueira total e irreversível; cerca de 25% de todos os casos novos de cegueira são atribuídos ao diabetes (Olefsky, 1990; Aiello & Cavallerano, 1994).

Paralisias dos músculos extra-oculares ocorrem devido a infarto isquêmico dos vasos que nutrem o nervo correspondente (Nelson & Martyn, 1998). Os músculos mais acometidos são o abducente e o oculomotor, sendo que, quando este último é envolvido, os reflexos pupilares quase sempre estão normais (Aiello & Cavallerano, 1994; Nelson & Martyn, 1998).

A recuperação da função muscular pode ocorrer normalmente em até 6 meses (Nelson & Martyn, 1998).

O nervo óptico não é afetado diretamente pelo diabetes; porém, associado a retinopatia diabética proliferativa, pode apresentar neovascularização (Aiello & Cavallerano, 1994). Atrofia óptica pode ser

verificada em pacientes com retinopatia diabética. A neuropatia óptica que ocorre nos diabéticos, pode ser de dois tipos: neuropatia óptica com atrofia óptica e as denominadas papilites (papilopatia diabética), além da neovascularização proliferativa (Benson, 1998; Kincaid, 1998).

A coróide, estrutura formada por muitos vasos, é a responsável pela nutrição das camadas mais externas da retina, principalmente a fóvea. Yanoff & Fine (1991) observaram aumento da espessura das arteríolas e capilares da coróide em pacientes diabéticos. Outros pesquisadores, usando estudo histológico e microscopia eletrônica, encontraram espessamento da membrana basal de vasos da coriocapilar e de outros pequenos vasos, além de arteriosclerose em pequenas artérias, confirmando achados descritos anteriormente (Saracco et al.; 1982; Hidayat & Fine, 1985; Rodrigues, 2000).

A retinopatia é a principal causa de perda permanente da visão nos diabéticos (Nelson & Martyn, 1998), estando presente em jovens e idosos, possuindo caráter crônico e progressivo (Duke – Elder & Dobree, 1967). O tempo de duração da doença tem papel fundamental na prevalência das manifestações da doença (Grey et al., 1986; Kincaid, 1998; Benson, 1998). Nos EUA, a retinopatia diabética é a principal causa de cegueira na população em idade produtiva (Kohner & Barry, 1984).

A retinopatia diabética proliferativa é bem mais freqüente nos diabéticos tipo 1, que nos tipo 2; aproximadamente 10 a 15% dos pacientes com diabetes tipo 1 desenvolvem cegueira legal ao longo da

vida (Sherwin, 2000). Com 10 anos ou mais de doença, aproximadamente 70% a 90% dos diabéticos do tipo 1 desenvolvem algum grau de retinopatia (Benson, 1998).

O controle metabólico do diabetes é importante fator na progressão e gravidade da retinopatia, sendo que, pacientes tratados de forma intensiva, tem reduzido o risco de complicações microvasculares havendo, portanto, forte associação entre o grau de controle metabólico e o desenvolvimento da retinopatia (Klein et al., 1994).

O mecanismo patogênico primário que antecede a retinopatia não proliferativa não está claro; mas a perda dos pericitos, células de apôio da parede endotelial e a hiperviscosidade, com estímulo a agregação de plaquetas, foram propostos (Olefsky, 1990; Benson 1998; Nelson & Martyn, 1998).

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

A retinopatia diabética se manifesta em dois estágios clínicos de lesão: não proliferativa e proliferativa. A retinopatia não proliferativa é subdividida em “simples” e “não proliferativa grave” ou avançada (Benson, 1998; Nelson & Martyn, 1998). Na simples, encontra-se com freqüência aumento da permeabilidade capilar, obstrução e

dilatação capilar, microaneurismas, *shunts* arteriovenosos, veias dilatadas, hemorragias, exsudatos duros, edema de retina e mácula (Nelson & Martyn, 1998). A retinopatia não proliferativa avançada apresenta exsudatos algodonosos, grandes áreas de não perfusão capilar e anormalidades microvasculares intra-retinianas ("*Intra-retinal micro-vascular abnormalities* ou IRMAS") (Benson, 1998; Nelson & Martyn, 1998).

A retinopatia proliferativa inicia-se quando ocorre a formação de neovasos, podendo apresentar membranas fibrovasculares, hemorragias vítreas e descolamento de retina (Benson, 1998; Nelson & Martyn, 1998).

O corpo ciliar, responsável pela produção do humor aquoso, apresenta-se com espessamento da membrana basal dos capilares e comprometimento estromal (Bosso, 2002). Usando angiografia, foi demonstrada a presença de tortuosidade vascular e dilatação aneurismática na vasculatura do corpo ciliar, em olhos provenientes de autópsia de indivíduos diabéticos (Morone et al., 1985).

A íris, porção mais anterior do trato uveal, é afetada em estado mais avançado da doença (Fryczkowski et al., 1989; Bandello et al., 1994; Pinto, 2002).

Os pacientes diabéticos apresentam com freqüência, pupila pouco reativa a estímulos luminosos e também a medicações que provocam a dilatação. Isto ocorre devido a alteração degenerativa dos

nervos e/ou músculos envolvidos neste mecanismo (Kincaid, 1998; Spirandelli et al.,1999).

A neovascularização e a presença de vacúolos no epitélio iriano são freqüentes em pacientes diabéticos (Aiello & Cavallerano, 1994; Kincaid, 1998). Esta neovascularização é caracterizada por pequenos e numerosos vasos sangüíneos anastomosados na superfície anterior da íris. Podem ser visibilizados através de angiogramas, nos quais é possível observar extravasamento de fluoresceína dos vasos em torno da margem pupilar (Aiello & Cavallerano, 1994; Kincaid, 1998).

Uma importante anormalidade oftalmológica, conseqüentemente ao acometimento da câmara anterior e do corpo ciliar, é o glaucoma. Os portadores de diabetes estão mais predispostos ao aparecimento de hipertensão ocular e também mais sujeitos ao desenvolvimento de glaucoma que os não diabéticos (Shields, 1989).

O glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) e o glaucoma neovascular são os tipos de glaucoma mais freqüentes associados a diabetes, sendo que o GPAA é 1,4 vez mais freqüente na população diabética que na não diabética (Aiello & Cavallerano, 1994). O diabetes também é considerado um fator de risco para desenvolvimento do GPAA em olhos com hipertensão ocular,devido ao provável comprometimento da microcirculação da cabeça do nervo óptico (Mikelberg & Drance, 1996).

O glaucoma neovascular ocorre em diabético como uma manifestação secundária da retinopatia proliferativa; a ocorrência do glaucoma neovascular está relacionada com a duração do diabetes, sendo infreqüente em pacientes com menos de 15 anos de duração da doença (Aiello & Cavallerano, 1994; Sassani et al., 1998).

A conjuntiva ocular é uma membrana mucosa que reveste a superfície interna das pálpebras e a superfície do bulbo ocular. Permite o movimento independente do olho e da pálpebra, proporciona muco para lubrificação da superfície ocular e contém tecido linfóide para proteção imunológica. Os vasos da conjuntiva bulbar podem apresentar microaneurismas, dilatação venosa e fragilidade capilar aumentada, com hemorragias subconjuntivais mais freqüentes que em indivíduos não diabéticos (Aiello & Cavallerano, 1994; Nelson & Martyn, 1998).

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

A córnea, porção importante do mecanismo refrativo do olho, também é afetada pela doença diabética, como exposto a seguir.

7. A CÓRNEA E O DIABETES

7.1. ANATOMIA MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA

A córnea é a porção anterior transparente do olho; mede aproximadamente 12,5 x 11,5 mm, sendo a espessura central mais delgada, com espessura de 0,52 mm e a periferia, com cerca de 0,65 mm. O seu poder de refração é de, aproximadamente, 70% de todo olho (Maurice, 1984).

A córnea apresenta cinco camadas: epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio. O epitélio é do tipo escamoso estratificado, com duas a três camadas de espessura no centro e quatro a cinco camadas na periferia. Mede aproximadamente 50 µ de espessura e se renova a cada sete a dez dias (Hogan et al., 1971).

As células epiteliais estão unidas por numerosos desmossomos e a forma celular é mantida por tonofilamentos (Kurpakus & Janes., 1991). As células basais, situadas mais profundamente, compõem uma única camada de células colunares que descansa sobre a membrana basal e mede 10 µ (Hogan et al., 1971).

A membrana de Bowman é composta de fibras colágenas tipo I; delimita o epitélio do estroma, protege o estroma contra invasão de microrganismos e não recupera a forma original após trauma. Mede aproximadamente 8 µ e é mais espessa na periferia (Hogan et al., 1971).

O estroma compõe 90% da espessura da córnea, composto de fibras colágenas, células do estroma e substância fundamental. Mede aproximadamente 450 µ. As fibras de colágeno estão dispostas em 200 a 300 lâminas, paralelas a superfície da córnea. É composta principalmente por colágeno tipo I e, em menor quantidade, por colágeno do tipo III, V e VI. A substância fundamental que rodeia a fibrila colágena é rica em glicosaminoglicanas que mantém a disposição regular do colágeno. Os ceratócitos são células que predominam no estroma e se transformam em fibroblastos no estroma lesado (Nakayasu et al., 1986; Marshal et al., 1991).

A membrana de Descemet é uma membrana basal, produzida pelo endotélio; contém colágeno tipo IV e fibronectina. Mede 3 µ ao nascimento, atingindo 8 a 10 µ na vida adulta. A célula endotelial, quando estimulada por inflamações, traumatismos ou alterações genéticas, pode produzir excesso de lâmina basal anormal que contém colágeno tipo I, espessando a membrana de Descemet e formando “pregas” de Descemet (Johnson et al., 1982).

Posteriormente a membrana de Descemet, o endotélio apresenta, em humanos, células hexagonais. Ao nascimento, estas células são em número de 3500 a 4000 células/mm² e na idade adulta, 2500 a 3000 células/mm². Não existe atividade mitótica após o nascimento; quando uma célula é perdida por qualquer fator, as células vizinhas ocupam o lugar do espaço vazio, resultando no aumento da área

celular e diminuição da densidade celular. Quando o número de células diminui em até cerca de 400 a 700 células mm², o metabolismo endotelial torna-se prejudicado, desencadeando edema estromal crônico (Waring et al., 1982).

A inervação sensorial da córnea deriva da primeira divisão do nervo trigêmio, ramo ciliar do nervo nasociliar. Na córnea as fibras nervosas caminham sub-epitelialmente, junto com a membrana de Bowman, lançando troncos em direção ao estroma. A sensibilidade corneal é muito maior no centro que na periferia (Rozsa & Beuerman, 1982).

7.2. ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA CÓRNEA

A córnea tem como funções principais a proteção do conteúdo ocular e a refração da luz. Para conservar essas propriedades, a córnea deve manter sua forma, integridade e transparência.

Vários fatores contribuem para manutenção e transparência da córnea: regularidade do epitélio, ausência de vasos sangüíneos e organização do colágeno (Hogan et al., 1971).

As células da córnea entre elas: células epiteliais, ceratócitos e células endoteliais, são metabolicamente ativas e requerem grande quantidade de energia para que desenvolvam suas funções e mantenham o seu equilíbrio (Kinoshita, 1962).

7.2.1. METABOLISMO

A principal fonte de energia utilizada pela célula corneal é a glicose, derivada 90% do humor aquoso e 10%, dos vasos límbicos ou da lágrima. O glicogênio é utilizado como reserva energética, sendo rapidamente consumido em condições anaeróbica ou traumática (Kinoshita, 1962).

A glicose entra na célula epitelial, facilitada pela difusão, e é utilizada ou estocada como glicogênio. A via glicolítica metaboliza glicose e piruvato para a produção de energia, utilizando oxigênio. Na ausência de oxigênio, o piruvato é metabolizado em lactato que necessita ser excretado pela célula. O acúmulo de lactato no epitélio e posteriormente no estroma, aumenta a força osmótica e retém água, produzindo edema epitelial e/ou estromal. A acidose produzida pelo acúmulo de lactato pode causar dano endotelial, morfológico e funcional (Kinoshita, 1962; Hogan et al., 1971).

O oxigênio utilizado pela célula corneal deriva parte do oxigênio atmosférico que se difunde no filme lacrimal e na córnea, através do epitélio; e o restante é oriundo do humor aquoso, independente da atmosfera. Este oxigênio é consumido rapidamente pelas células

endoteliais, devido ao grande número de mitocôndrias e das altas taxas de fosforilação oxidativa (Klyce & Beurman, 1988).

7.2.2. CONTROLE DE HIDRATAÇÃO E TRANSPARÊNCIA

O controle da hidratação do estroma é essencial para a transparência corneal. A água constitui 78% do peso, seguido de 15% de colágeno, 5% de outras proteínas, 0,7% de sulfato de Keratan, 0,3% sulfato de condroitina e 1% de sais (Hogan et al., 1971).

São vários os mecanismos que desempenham função na regularização e hidratação corneal:

I - Função da barreira do epitélio e endotélio: barreira contra água e eletrólitos, protege o estroma de uma hidratação excessiva. O epitélio constitui uma membrana semi-permeável suscetível a trauma inflamação e hipóxia (Maurice, 1951). O endotélio, por ser unicelular, é 200 vezes mais permeável aos eletrólitos que o epitélio.

II - Pressão de hidratação do estroma: é pressão que alcança valores entre 40 a 50 mmHg, causando acúmulo de líquido nos proteoglicanos entre as fibrilas colágenas. Quando há aumento de 55% de espessura da córnea, a pressão de hidratação cai para um terço do seu valor inicial (Dohlman et al., 1962).

III - Transporte iônico pelo epitélio e endotélio*:* A diminuição da temperatura, queda da taxa de oxigênio e glicose, glicólise anaeróbica, desencadeiam edema estromal por acúmulo de líquido entre as fibrilas colágenas. O transporte ativo de íons, principalmente bicarbonato, através do endotélio, propicia movimento de íons do estroma para o humor aquoso e, conseqüentemente, água e dióxido de carbono, mantendo a transparência corneal (Maurice, 1972).

IV - Pressão intra-ocular*:* na presença de epitélio integro variações de pressão entre 0 a 40 ou 50 mmHg, por pouco tempo, não determina edema corneal significativo. No entanto, na presença de lesão endotelial, variações de PIO constituem um fator importante no desenvolvimento de edema (McPhee et al., 1985).

7.3. CÓRNEA E ALTERAÇÕES DIABETICAS

O diabetes tem efeito significativo na morfologia, fisiologia e aspectos clínicos da córnea. Mudanças morfológicas são encontradas no epitélio, membrana basal estroma e endotélio. A homeostase destas estruturas pode estar alterada diante desta patologia.

O epitélio corneal tem sido muito estudado por sofrer alterações na sua dinâmica. Schultz et al. (1984), acompanhando 122 pacientes, divididos em grupo diabético e não diabético, durante 3 anos

observou associação de lesão recorrente epitelial e diminuição da sensibilidade táctil corneal.

Rosemberg (2000), acompanhando 23 pacientes com diabetes tipo 1, observaram defeitos epiteliais recorrentes, irregularidades das fibras nervosas, associados com a duração da patologia; a diminuição das fibras nervosas esteve relacionada com a diminuição da sensibilidade corneal.

Kaji et al. (2000), examinando 8 córneas de cadáveres de indivíduos diabéticos, avaliaram o papel dos produtos de glicolização (AGES), usando anticorpos monoclonal anti-AGES e cultura de células, observando acúmulos deste material na membrana basal do epitélio. Foi sugerido a partir deste estudo que o acúmulo de AGES na membrana basal poderia ser a causa da desordem epitelial nos pacientes diabéticos.

Outro aspecto bastante enfocado dentro do tema córnea e diabetes, a hipoestesia corneal tem sido descrita dentro do quadro de alterações neurológicas do diabetes. Afeta ambos os olhos, simetricamente, e resulta de uma polineurite difusa do nervo trigêmeo e seus ramos. A ceratopatia desencadeada pela perda de sensibilidade pode estar associada à duração da doença e à severidade da retinopatia (Benson, 1998; Ginsberg, 1998; Kincaid, 1998; Nelson & Martyn, 1998). A diminuição da sensibilidade corneal, associada à redução da produção lacrimal e distrofia da membrana basal do epitélio, aumentam o risco de

aparecimento de erosões recorrentes e úlceras neurotróficas na córnea (Ginsberg, 1998; Kincaid, 1998).

Na neuropatia, o fator de crescimento do nervo encontra-se diminuído nos pacientes diabéticos, limitando sua capacidade regenerativa. Ela se desenvolve em humanos e animais de experimentação, principalmente nos nervos periféricos, possivelmente por distúrbios metabólicos neurais, desencadeados pela hiperglicemia (Ishida et al., 1984).

As células de Schwann, estudadas ao microscópio eletrônico, são irregulares, com pontos de espessamento alternando com afinamentos isolados e degeneração axonal. Estes achados foram observados no transcorrer daquele estudo e acredita-se existir associação entre a exposição à doença e o tempo de duração da mesma (Ishida et al., 1984).

O endotélio porção mais posterior da córnea e responsável pela sua transparência e nutrição, sofre modificação na sua fisiologia quando exposto a situação de hiperglicemia e hipóxia (McNamara et al., 1998).

7.3.1. ENDOTÉLIO CORNEAL E DIABETES

Mudanças na estrutura do endotélio corneal relacionadas ao diabetes, tem sido observadas em humanos e em animais de

experimentação. A maioria dos estudos que tratam deste assunto falam da hidratação corneana e de alterações na bomba endotelial de energia.

Schultz et al. (1984) relatam que diabéticos tipo 2 apresentam alteração na densidade celular e diminuição de células hexagonais, quando comparados a indivíduos não diabéticos.

Herse (1990), estudando a influência da hiperglicemia no controle da hidratação corneal em coelhos diabéticos por Aloxana, observou que altos níveis de glicose ocasionaram anormalidade na hidratação corneal, ocorrendo hidratação estromal, com conseqüente aumento da espessura da córnea.

Matsuda et al. (1990) encontraram, em ratos diabéticos tratados com inibidor da aldose redutase, pleomorfismo e polimegatismo discretos.

Datiles et al. (1990), estudando o efeito do Sorbinil, um inibidor da aldose redutase, em olhos de cães com galactosemia, observaram diminuição significativa da densidade celular e aumento da área celular em olhos de cães não tratados com o Sorbinil. Estes achados são similares aos encontrados em estudos experimentais, realizados em cães e ratos, e também observados em pacientes diabéticos, podendo-se preveni-lo com a administração de inibidor da aldose redutase, o que firma o papel desta enzima na anormalidade endotelial.

Keoleian et al.(1992), avaliaram a estrutura e a função do endotélio corneal em 14 pacientes com diabetes crônico tipo 1 e sem

retinopatia diabética proliferativa; foi observado aumento do coeficiente de variação da área celular, diminuição das células hexagonais, aumento da auto-fluorescência corneal e aumento da pressão intra-ocular. No entanto, não houve aumento da espessura corneal ou da permeabilidade endotelial à fluorescência.

Ohguro et al. (1995) avaliaram os efeitos da aldose redutase tópica em pacientes diabéticos com alteração endotelial, com instilação tópica de 0,5% de inibidor de aldose redutase (CT-112), durante 3 meses e observaram resolução das alterações endoteliais. Também esta observação sugeriu que aldose redutase está envolvida na etiologia das variações endoteliais em diabéticos.

Weston et al. (1995), avaliando o controle de hidratação da córnea em pacientes diabéticos, observaram espessamento da córnea e auto-fluorescência em pacientes diabéticos submetidos a hipóxia, com uso de lente de contato. Ocorreu aumento do edema corneal, alteração da morfologia da célula endotelial e diminuição da permeabilidade endotelial, efeitos estes, relacionados com a severidade da doença.

Herse & Adams(1995), estudando durante 10 a 20 semanas o efeito da duração da hiperglicemia no espessamento corneal e a atividade da ATPase endotelial, observaram aumento da atividade de Na+/K+ ATPase no endotélio corneal de coelhos normais; porém, em coelhos diabéticos por aloxana, houve diminuição da atividade Na+/K+ ATPase em 5 semanas. Este estudo mostra que a hiperglicemia em

coelho está associada a uma complexa interação dinâmica entre o espessamento corneal e a atividade Mg++ ATPase e a atividade Na+/K+ ATPase.

Yee et al. (1985) encontraram mudanças semelhantes em cachorros com diabetes.

Saini & Mittal (1996) avaliaram a função endotelial em pacientes com diabetes não insulino-dependente, com e sem retinopatia diabética. Após o uso de lente de contato hidrofílica foi avaliada a transmissibilidade de oxigênio e a regressão do edema endotelial. Os resultados indicaram diminuição da função endotelial, particularmente em pacientes com retinopatia diabética. Nestes pacientes, o endotélio corneal tem alto risco de descompensação, quando exposto a um stress clínico, incluindo cirurgia intra-ocular ou uso de lente de contato.

Larsson et al.(1996) relataram que a densidade de células endoteliais, coeficiente de variação de área celular e a porcentagem de células hexagonais não diferem significativamente entre diabéticos e não diabéticos.

McNamara et al. (1998) avaliaram a função corneal de pacientes diabéticos na vigência de altos níveis séricos de glicose, encontrando edema corneal e diminuição da capacidade da córnea de se recuperar em estados de hipóxia, sugerindo que a hiperglicemia afeta o controle da hidratação corneal.

Roszkowska et al.(1999) relataram, em paciente diabético tipo 2, diminuição do coeficiente de variação da área celular (polimegatismo) e diminuição de células hexagonais (pleomorfismo).

Ziad et al. (2002) avaliaram o controle da hidratação corneal em 15 pacientes diabéticos submetidos a hipóxia com uso de lente de contato por 2 horas, comparando-os ao grupo controle. A falta na capacidade de recuperação da espessura inicial, causada pelo edema, sugere disfunção endotelial desencadeada pelo metabolismo anaeróbico.

8. JUSTIFICATIVA DA PROPOSTA

Observa-se, assim, que a literatura sobre o acometimento do endotélio corneal em seres humanos pela doença diabética está restrita a avaliação do número e da forma das células, além de estudos envolvendo a bioquímica celular.

Avaliações do que se passa na intimidade da célula, ou seja, na ultra-estrutura celular até o presente momento, não foram encontradas referencias na literatura, sendo este o objetivo do presente estudo que foi desenvolvido usando um modelo de diabetes experimental, o diabetes aloxânico, tendo o rato como animal de experimentação.

Este é um modelo estabelecido por Macedo et al.(1986) e que vem sendo usado pelo Grupo de Estudos do Diabetes Experimental, atualmente coordenado pelo Dr. César Tadeu Spadella, na Faculdade de Medicina de Botucatu.

OBJETIVO

OBJETIVO

Este estudo foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

- Avaliar a ultra-estrutura do endotélio corneal de ratos normais de 4 meses e 15 dias e 15 meses e 15 dias de idade.

- Avaliar a ultra-estrutura do endotélio corneal de ratos diabéticos aloxânicos de 4 meses e 15 dias e 15 meses e 15 dias de idade.

- Comparar a ultra-estrutura do endotélio corneal de ratos normais e diabéticos.

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL E MÉTODO

Foi desenvolvido um estudo experimental, de caráter prospectivo, seguindo-se os princípios da indução da doença diabética e avaliação dos animais preconizados pelo Grupo de Estudo do Diabetes Experimental – UNESP, Botucatu, que serão aqui pormenorizados.

1. ANIMAIS UTILIZADOS

Os animais utilizados no presente estudo foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu – UNESP.

Foram utilizados 20 ratos da raça Wistar, de ambos os sexos com idade de 3 meses, peso de 200 a 300 g cada e sadios ao exame clínico.

Durante o estudo, os animais que morreram antes da época do sacrifício, foram substituídos por outros, com as mesmas características. Não há registros de quantos animais morreram e foram substituídos.

2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais, usando a técnica de sorteio, assim distribuídos:

- GRUPO CONTROLE (GC): formado por 10 ratos normais.

- GRUPO DIABÉTICO (GD): foi formado por 10 ratos diabéticos que não receberam qualquer tratamento.

3. MOMENTOS EXPERIMENTAIS

Foi considerado como momento zero (M0) o dia do sorteio dos ratos para os respectivos grupos experimentais, coincidindo com o dia da indução do diabetes nos animais do grupo diabético.

Considerou-se como momento um (M1), o dia do início do seguimento dos animais, o que ocorreu 15 dias após M0.

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

M2 -1 mês após M1

M3 -12 meses após M1

Foram sacrificados 5 ratos do GC e 5 ratos do GD no M2; e 5 ratos do GC e 5 ratos do GD em M3.

No diagrama a seguir é apresentado resumidamente como se deu a seqüência dos momentos experimentais.

Diagrama dos momentos experimentais

Idade	3 meses	3 m+15 d	4 m+15 d	15 meses+15d
Momento	M0.	M1	M2	M3
Sorteio	M0	-	-	-
Indução	Δ	▲	-	-
	GC	-	†	†
	GD	▲	†	†

Δ – momento em que houve a indução do diabetes, nos ratos do GD.

▲- diabetes instalado.

†- sacrifício dos animais.

4. PARÂMETROS ESTUDADOS

4.1. PARÂMETROS CLÍNICOS

Os animais foram avaliados clinicamente todos os dias, tendo-se como base os seguintes parâmetros: comportamento, aspecto geral, peso (g), ingestão hídrica (ml/24h) e diurese (ml/24h).

4.2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Realizada pesquisa diária no período da manhã e da tarde da glicosúria. Mensalmente avaliou-se a glicemia de jejum (mg%) e a glicose urinária (mg%). Os resultados apresentados no presente estudo serão os referentes a média dos dados obtidos no dia do sacrifício.

4.3. PARÂMETROS MORFOLÓGICOS

Os parâmetros morfológicos foram obtidos dos 20 animais, em cada um dos respectivos momentos experimentais em que foram sacrificados, sendo avaliado o endotélio por microscopia eletrônica de transmissão.

5. SEQÜÊNCIA DOS TEMPOS EXPERIMENTAIS

- Pesagem dos animais;

- Sorteio dos animais, para distribuição nos respectivos grupos experimentais (M0);

- Administração de Aloxana 2% (J.T. Baker Chemical Co) nos animais do GD, para indução do diabetes experimental;

- Avaliação clinico-laboratorial 15 dias após M0;

- Avaliação clínico-laboratorial mensal a partir do M1;

- Observação diária do aspecto geral, da diurese, da ingestão hídrica, da glicosúria e da cetonúria a partir do M1;

- Sacrifício dos animais previamente anestesiados, de acordo com os momentos experimentais;

- Imediata enucleação dos olhos;

- Processamento dos olhos para exame ultra-estrutural.

6. TÉCNICAS UTILIZADAS

6.1. INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL

Os animais receberam injeção endovenosa de solução aquosa de Aloxana 2% (2,4,5,6 tetra-oxo-hexahydropyrimidine), na dose

única de 42 miligramas por quilograma de peso corporal para indução do diabetes.

Previamente a indução, os animais foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas, recebendo água “ad libitum”. A seguir, para facilitar a visibilização das veias caudais, cada animal foi colocado em uma caixa aquecida com lâmpada elétrica, por cerca de 10 minutos. Posteriormente, os ratos foram transferidos para uma pequena caixa de contenção, que permitiu que suas caudas ficassem expostas.

Foi usada agulha de calibre 13x4 (27Gx33/64) para administração da droga, o que foi feito em uma das veias caudais.

Os animais foram realimentados normalmente 30 minutos após a injeção.

Após um período de 15 dias, necessário para definição de quais os animais portadores de diabetes grave, ou seja, os animais que apresentaram perda de peso, aumento da ingestão hídrica e do volume urinário, acompanhados de alterações laboratoriais de glicemia de jejum acima de 200 mg %, glicose urinária superior ou igual a 3.000 mg % e glicosúria positiva (+++) no teste de fitas reagentes, foi iniciado o seguimento.

Os animais que não preencheram os critérios adotados para definição de diabetes grave, foram descartados ou substituídos. Foram também substituídos os animais que vieram a morrer antes do período

programado para o sacrifício. O número total destes animais descartados e substituídos não ficou registrado.

6.2. MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

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

Os ratos receberam ração Nuvilab – CR 1 (Nuvital, Nutrientes e Produtos Veterinários Ltda – Pr) e água " *ad libitun* ".

6.3. COLETA DE MATERIAL PARA OBTENÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS LABORATORIAIS

A coleta e avaliações clínico-laboratoriais foram realizadas 15 dias após a indução do diabetes e mensalmente da seguinte forma:

- Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais durante 24 horas;

- Neste período foi fornecido volume conhecido de água e quantidade conhecida de ração Nuvilab – CR 1;

- Após este período os animais entraram em jejum de 12 horas;

- No final do período de jejum, os animais foram pesados e avaliados os volumes, tanto de água ingerida (ml/24h), como de diurese (ml/24h);

- Coletadas amostras de 10 ml de urina de 24h, para dosagem de glicose urinária (mg%), seguida da realização da glicosúria e cetonúria;

- Coletadas amostras de 1,5 ml de sangue para dosagem da glicose plasmática (mg%), cortando-se 1,0 mm da ponta da cauda do animal;

- Após a retirada de sangue, a cauda seccionada foi amarrada com fio de algodão 2-0.

6.4. EXAMES BIOQUÍMICOS

- A dosagem de glicose plasmática e urinária foram realizadas respectivamente, no laboratório clínico do Departamento de Clínica Médica e no Laboratório de Pesquisa Experimental do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP; sendo empregado o Método da Ortotoluidina (DUBOWSKI, 1962).

- A pesquisa de glicose e de corpos cetônicos na urina,: realizadas no laboratório de Técnica Cirúrgica e no Laboratório Cirurgia

Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, sendo empregada fitas reagentes Gluketur-test (Boëhringer Mannhein M.B. Bioquímica LTDA – RJ).

6.5. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

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

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

6.6. PREPARO DOS OLHOS PARA EXAME MORFOLÓGICO

Após a enucleação, um dos olhos foi preparado para exame ultra-estrutural como se segue:

- fixação em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.3;

- secção sagital do globo ao nível do equador, usando lamina de barbear;

- dissecção do globo ocular, com auxilio de pinça sobre lupa (Karl Zein), com aumento de 2,0 vezes;

- separação das diversas estruturas do olhos, inclusive da córnea, com auxilio de 2 pinças delicadas;

- recorte da córnea, em fragmentos de 3x1 mm, com lâmina de barbear, sobre cera de dentista rosa, em gota de solução fixadora (glutaraldeído 2,5%);

- coleta dos fragmentos, por meio de pipetas, sendo os mesmos recolocados em glutaraldeído 2,5%, por período de 3horas.

- pós-fixação em ósmio 1%, em tampão fosfato 0,1M, pH7,3;

- desidratação em série crescente de acetonas (50, 70, 90 e 100%);

- mergulho dos fragmentos em mistura acetona/araldite por 12 horas;

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

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

- trimagem dos blocos, sob lupa com auxilio de lâmina de barbear;

- cortes semi-finos de 0,5 micrômetro, que foram colocados sob lâminas e corados com mistura de 1:1 de azul de metileno a 1% e de Azur II a 1%;

- exame em microscópio óptico e escolha dos cortes semi-finos apropriados;

- cortes ultra-finos (500 Angstrons), feitos a partir dos cortes semi-finos escolhidos;

- exame em microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 301.

6.7. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Foram obtidos, ao microscópio eletrônico de transmissão, micrografias da região correspondente ao endotélio corneal.

A documentação fotográfica do material foi realizada usando-se o filme Ektacrome Kodak.

O papel fotográfico utilizado foi o Kodacrome RC Print F 3 Kodak.

6.8. ANALISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes aos parâmetros clínicos e bioquímicos, obtidos no dia do sacrifício, foram submetidos a análise estatística, utilizando-se a técnica de Análise de Variância para o modelo com dois

fatores (grupo e momento), sendo o procedimento paramétrico, quando os dados apresentaram característica de distribuição normal de probabilidade e não paramétrico, na ausência desta (Norman & Streiner, 1994; Montgomery, 1991).

Para apresentação dos resultados considerou-se nas tabelas a significância, apontada por letras, interpretando-se da seguinte forma: duas letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

As letras minúsculas comparam os dois grupos e as maiúsculas, os momentos dentro de cada grupo.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. PARÂMETROS CLÍNICOS

Foram observados parâmetros clínicos distintos entre os dois grupos experimentais, sendo possível diferenciá-los pela observação do comportamento e do aspecto físico dos animais.

1.1. OBSERVAÇÃO CLÍNICA

1.1.1. GRUPO CONTROLE

Os animais do GC quando comparados ao do grupo GD eram mais calmos, limpos, pois executavam o “ritual de limpeza” lambendo os pelos, eram ativos, apresentando ganho de peso, ingestão hídrica, alimentar e diurese esperadas para ratos sadios.

1.1.2. GRUPO DIABÉTICO

Os animais do GD não apresentaram boa evolução, evoluindo com queda progressiva do estado geral, eram apáticos e magros, com alterações na pelagem como queda de pelos, pelos eriçados, com pouco brilho, coloração amarelada devido ao fato de não

executarem o “ritual de limpeza”, como o fazem os ratos normais, e freqüentemente apresentando pediculose ou piodermites.

Estes animais também apresentaram perda de peso, ingestão de água em maior quantidade, dor a manipulação, consumiram mais alimento e tiveram a diurese aumentada e de odor fétido.

Os animais do GD morreram mais facilmente, principalmente no período logo após a indução do diabetes ou no início do experimento. Observou-se, ainda, que alguns animais do grupo diabético logo após a indução do diabetes ou no início do experimento apresentaram reversão do estado diabético espontaneamente. Nas duas situações, estes animais foram, desprezados e/ou substituídos. Não há registros da quantidade de ratos que morreram e foram substituídos

1.2. AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL

A avaliação das medidas do peso corporal dos animais do GC mostrou haver diferença significativa entre os momentos M2 e M3, sendo que no início do experimento a média de peso foi inferior a observada no final.

Os animais do GD apresentaram média de peso semelhante no M2, como no M3.

Os valores médios de peso dos ratos do GC foram superiores aos do GD, tanto no M2, como no M3 (Tabela 1).

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

GRUPO	**MOMENTO DO SACRIFÍCIO**	
	M2	**M3**
GC	351,00 ± 18,84 **b**	416,00 ± 58,03 **b**
	A	**B**
GD	246,00 ± 30,08 **a**	284,00 ± 33,43 **a**
	A	**A**

GC= Grupo Controle
GD= Grupo Diabético
M2= 1 mês após M1
M3= 12 meses após M1
Letras maiúsculas comparam momentos
Letras minúsculas comparam grupos
$p < 0,05$

1.3. AVALIAÇÃO DA DIURESE

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

Quando comparados os animais do GC com os do GD, observou-se valores muito superiores de diurese nos animais do GD, com diferença estatística significativa nos dois momentos estudados (Tabela 2).

TABELA 2 – Mediana e semi-amplitude total dos valores de diurese (ml/24h) dos grupos experimentais, no momento do sacrifício e respectivos resultados do teste estatístico.

GRUPO	MOMENTO DO SACRIFÍCIO	
	M2	**M3**
GC	12,00 ± 4,00 **a**	16,00 ± 7,50 **a**
	A	**A**
GD	77,00 ± 42,00 **b**	90,00 ± 42,50 **b**
	A	**A**

GC= Grupo Controle
GD= Grupo Diabético
M2= 1 mês após M1
M3= 12 meses após M1
Letras maiúsculas comparam momentos
Letras minúsculas comparam grupos
$p < 0,05$

1.4. AVALIAÇÃO DA INGESTÃO HÍDRICA

Comparando-se a ingestão hídrica dos animais do GC em M2 e M3 e de GD em M2 e M3, os valores médios foram semelhantes em ambos os grupos.

Comparando-se a ingestão hídrica dos animais do GD com os do GC, observou-se níveis bastante superiores no GD, nos dois momentos do estudo (Tabela 3).

TABELA 3 – Média e desvio padrão dos valores de ingestão hídrica (ml/24h) dos grupos experimentais, nos momentos de sacrifício e respectivos resultados do teste estatístico.

GRUPO	MOMENTO DO SACRIFÍCIO	
	M2	M3
GC	48,00 ± 6,00 **a** **A**	55,00 ± 22,00 **a** **A**
GD	118,00 ± 36,00 **b** **A**	138,00 ± 19,00 **b** **A**

GC= Grupo Controle GD= Grupo Diabético
M2= 1 mês após M1 M3= 12 meses após M1
Letras maiúsculas comparam momentos Letras minúsculas comparam grupos $p < 0,05$

2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

2.1. GLICEMIA

A mediana da glicemia dos animais do GC no M2 e no M3 e do GD no M2 e no M3 foram semelhantes nos dois momentos experimentais.

Comparando-se GC com GD, em ambos os momentos experimentais, os animais do GD apresentaram valores superiores aos do GC (Tabela 4).

TABELA 4 – Mediana e semi-amplitude total dos valores da glicemia (mg%) dos grupos experimentais, nos momentos de sacrifício e respectivos resultados do teste estatístico.

GRUPO	**MOMENTO DO SACRIFÍCIO**	
	M2	**M3**
GC	102,00 ± 11,50 **a** **A**	128,00 ± 25,00 **a** **A**
GD	474,00 ± 125,50 **b** **A**	482,00 ± 174,00 **b** **A**

GC= Grupo Controle GD= Grupo Diabético
M2= 1 mês após M1 M3= 12 meses após M1
Letras maiúsculas comparam momentos Letras minúsculas comparam grupos $p < 0,05$

2.2. GLICOSE URINÁRIA

A mediana da glicose urinária dos animais do GC, assim como os do GD, foi semelhante em ambos momentos experimentais.

Comparando-se os animais do GC com os do GD, os valores obtidos nos animais do GD foi muito superior aos observados no GC, em ambos os momentos experimentais (Tabela 5).

TABELA 5 – Mediana e semi-amplitude total dos valores de glicose urinária (mg%) dos grupos experimentais, nos momentos de sacrifício e respectivos resultados do teste estatístico.

GRUPO	**MOMENTO DO SACRIFÍCIO**	
	M2	**M3**
GC	8,00 ± 2,50 **a**	19,00 ± 9,00 **a**
	A	**B**
GD	5.212,00 ± 1.139,00 **b**	4.484,00 ± 573,50 **b**
	A	**A**

GC= Grupo Controle
GD= Grupo Diabético
M2= 1 mês após M1
M3= 12 meses após M1
Letras maiúsculas comparam momentos
Letras minúsculas comparam grupos
$p < 0,05$

3. PARÂMETROS MORFOLÓGICOS

3.1. GC M2 (Figuras 1,2,3,4,5,6,7,8)

À microscopia eletrônica de transmissão observou-se que o endotélio corneal de ratos é composto por uma única camada de células poligonais, de formato principalmente retangular ao corte transversal.

O núcleo celular é alongado, com o maior eixo paralelo ao maior eixo da célula. Possui cromatina mais condensada próximo a carioteca e contém poros na membrana nuclear. Em alguns núcleos foi possível observar nucléolo.

As células endoteliais encontram-se unidas entre si na face lateral, por junções íntimas no seu terço superior, ou seja, em contato com a câmara anterior. As junções selantes são seguidas por mácula aderente e complexas interdigitações.

A união entre as células endoteliais se dá de forma oblíqua em relação a base da célula.

Na região de união entre células, existem projeções da superfície celular ou pregas marginais que, partindo da célula endotelial se dirigem para a câmara anterior. Algumas figuras de macropinocitose foram observadas nas regiões coincidentes com estas pregas marginais.

Na porção apical, a célula tem contacto com a câmara anterior. Nesta localização, além das pregas marginais já descritas, a célula não possui superfície lisa, mas sim estão presentes pequenas saliências ou reentrâncias que, as vezes, são vistas como vesículas pinocitóticas.

A porção basal da célula endotelial está em contacto com a Membrana de Descemet, havendo adesões focais entre a célula endotelial e a Membrana de Descemet. Na superfície de contacto entre a célula endotelial e a Membrana de Descemet existem também as vesículas pinocitóticas que fazem com que, a exemplo da porção apical da célula, a superfície desta porção também não seja lisa.

Algumas vezes, tem-se a impressão de que vesículas presentes no citoplasma basal possam ser resultados de invaginação da Membrana de Descemet, em decorrência do seu conteúdo possuir a mesma elétron-densidade daquela.

O citoplasma da célula endotelial é rico em organelas. As organelas citoplasmáticas são mais escassas na superfície basal da célula.

As mitocôndrias, redondas ou ovais, são abundantes e distribuem-se de forma agrupada por todo o citoplasma.

O retículo endoplasmático, nas suas formas liso e rugoso, assim como os ribossomos livres, também são abundantes e distribuem-se de forma aleatória.

Já, o complexo de Golgi que é bem desenvolvido nestas células, possui várias cisternas e vesículas ao seu redor, estando localizado, preferencialmente, na porção apical da célula, mais próximo da câmara anterior.

Inúmeras vesículas de tamanhos variados e algumas vesículas recobertas, são reconhecidas no citoplasma.

Nos animais do GC M2 foram raramente observados corpos densos e figuras de Mielina, dentro de vacúolos opticamente vazios.

3.2. **GC M3** (Figuras 9,10,11,12)

De modo geral, as células endoteliais e seus constituintes foram semelhantes as observadas nos animais do GCM2, não havendo diferença quanto ao aspecto ou quanto ao número de componentes celulares, exceto pela aparente maior freqüência de corpos densos.

3.3. **GD M2** (Figuras 13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24)

Observou-se que os animais do GDM2 apresentaram diferenças com relação aos componentes celulares encontrados nos animais normais, embora mantivessem a mesma estrutura celular e nuclear. Alguns núcleos apresentaram descondensação da cromatina, podendo-se algumas vezes se observar a presença de nucléolos.

Assim, a avaliação subjetiva apontou para aumento do número de vesículas citoplasmáticas, ocorrendo em todo o citoplasma e, principalmente, na porção apical da célula, próximo ao complexo de Golgi. Na superfície basal, as vesículas de conteúdo de eletron-densidade semelhante à Membrana de Descemet também estiveram aumentadas.

Mitocôndrias edemaciadas, apresentando diminuição do número de cristas, algumas com alterações importantes na estrutura interna, como aumento do espaço inter-membranoso, como se tivesse ocorrido diminuição do espaço da câmara mitocondrial interna. Figuras de Mielina muitas vezes substituíram as cristas mitocondriais.

Vacúolos envoltos por dupla membrana foram observados, podendo ter sido o resultado da destruição de mitocôndrias.

Houve, ainda, aumento dos corpos densos e de ribossomos livres.

Rarefação citoplasmática, observada principalmente na região basal das células, ocorreu em alguns animais.

3.4. **GD M3** (Figuras 25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36)

Comparando-se os animais de GDM3 com os normais ou com os do GDM2, há profundas diferenças entre eles.

A superfície de contacto entre as células endoteliais e a membrana de Descemet esteve aumentada por conta do aumento de saliências e reentrâncias existentes entre as duas camadas.

Ocorreram alterações tanto no núcleo, como no citoplasma, observadas em todos os animais.

Nos núcleos observou - se, na maioria das células, dispersão da cromatina nuclear e separação das membranas do "envelope" nuclear.

No citoplasma, além da dilatação dos retículos e do aumento das vesículas, as mitocôndrias estiveram bastante alteradas, havendo poucas com morfologia semelhante ao que foi observado nos animais normais. As alterações mitocondriais foram de diferentes intensidades, chegando-se a destruição das mesmas, vistas como vacúolos de conteúdo elétron-transparente ou contendo figuras de Mielina.

Ainda no citoplasma, foram observados corpos multivesiculares.

Também os corpos densos estiveram aumentados, contendo imagens bastante elétron-densas, circulares ou ovóides,

sugestivas de grânulos de glicogênio que foram extraídos durante a preparação do material para exame ultra-estrutural.

Áreas de rarefação citoplasmática, com diminuição das organelas do citosol, foram observadas principalmente na região basal da célula, em muitos dos cortes avaliados.

4. LEGENDA DAS FIGURAS

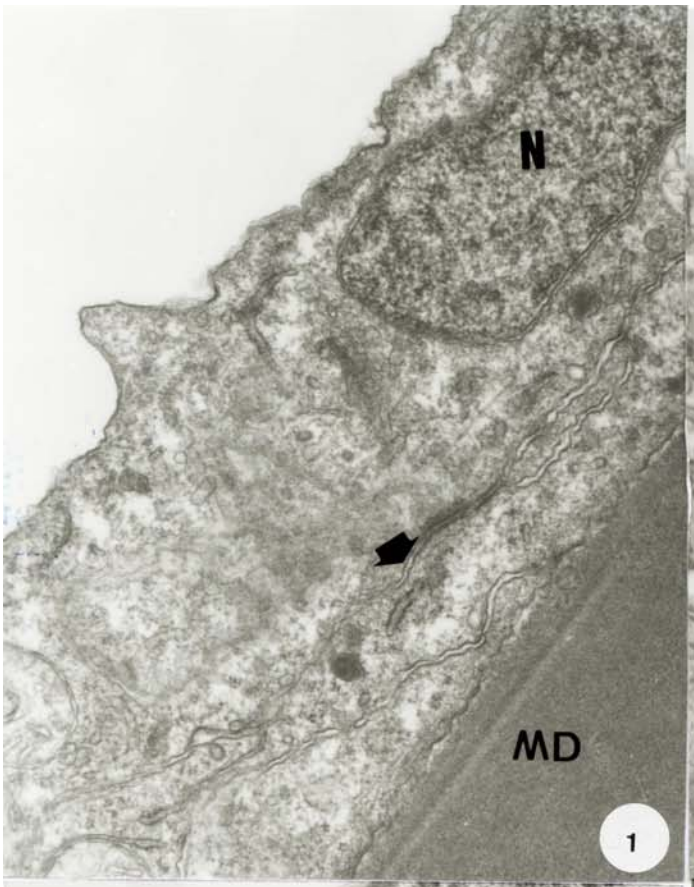
GC M2

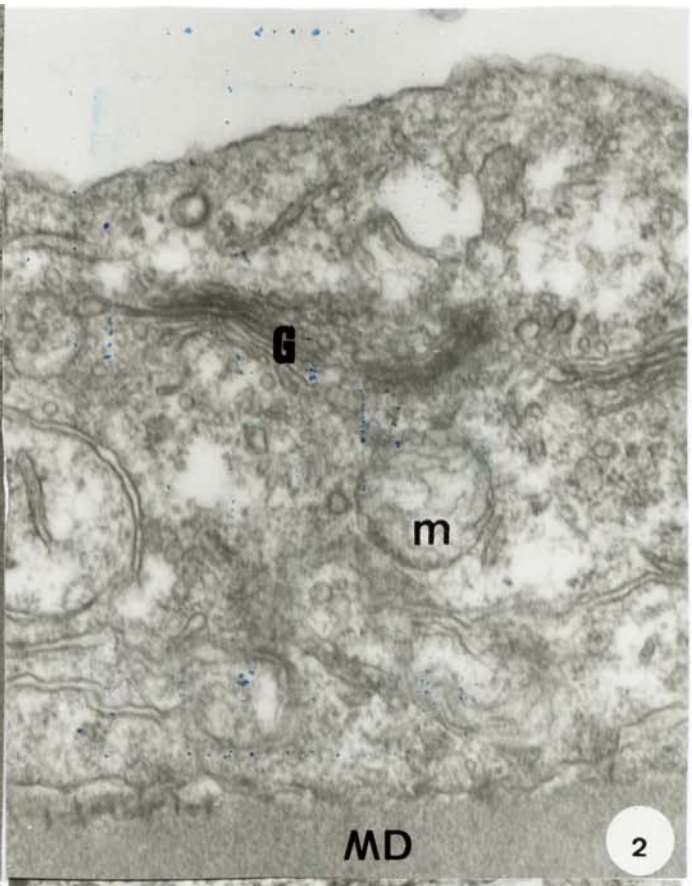
Figura 1 – Células endoteliais corneais unidas de forma oblíqua (seta). Núcleo (N) alongado, contendo cromatina mais condensada próximo à carioteca. Membrana de Descemet (MD) (X23000).

Figura 2 – O citoplasma da célula endotelial corneal é rico em mitocôndrias (m) e o aparelho de Golgi (G) é bem desenvolvido (X42000).

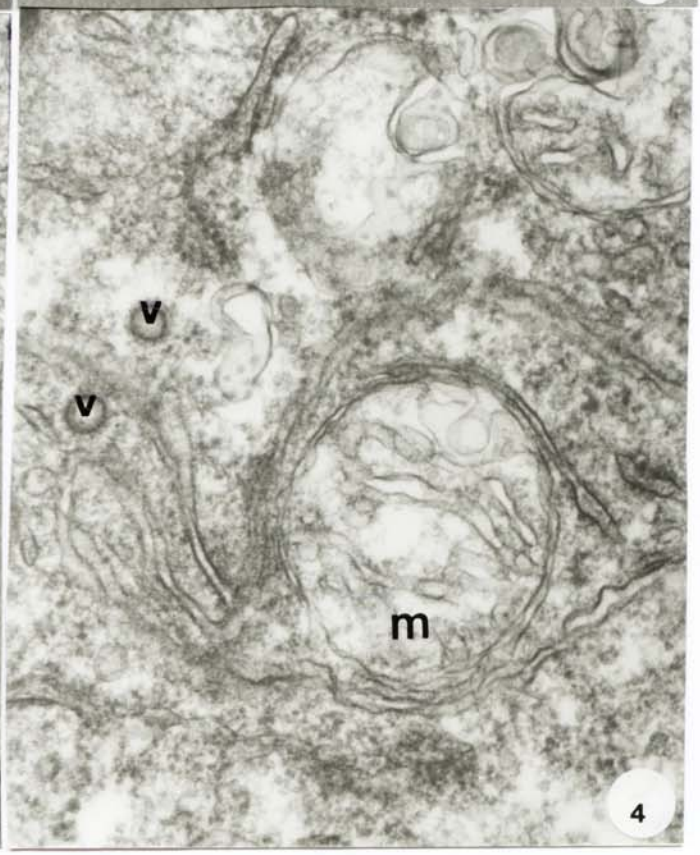
Figura 3 – O retículo endoplasmático (seta branca) também é bem desenvolvido. Núcleo (N). Mitocôndria (m) (X23000).

Figura 4 – O citoplasma é rico em vesículas (v). Mitocôndria (m) (X57500).


N
MD
1


G
m
MD
2

m
N
3


v
v
m
4

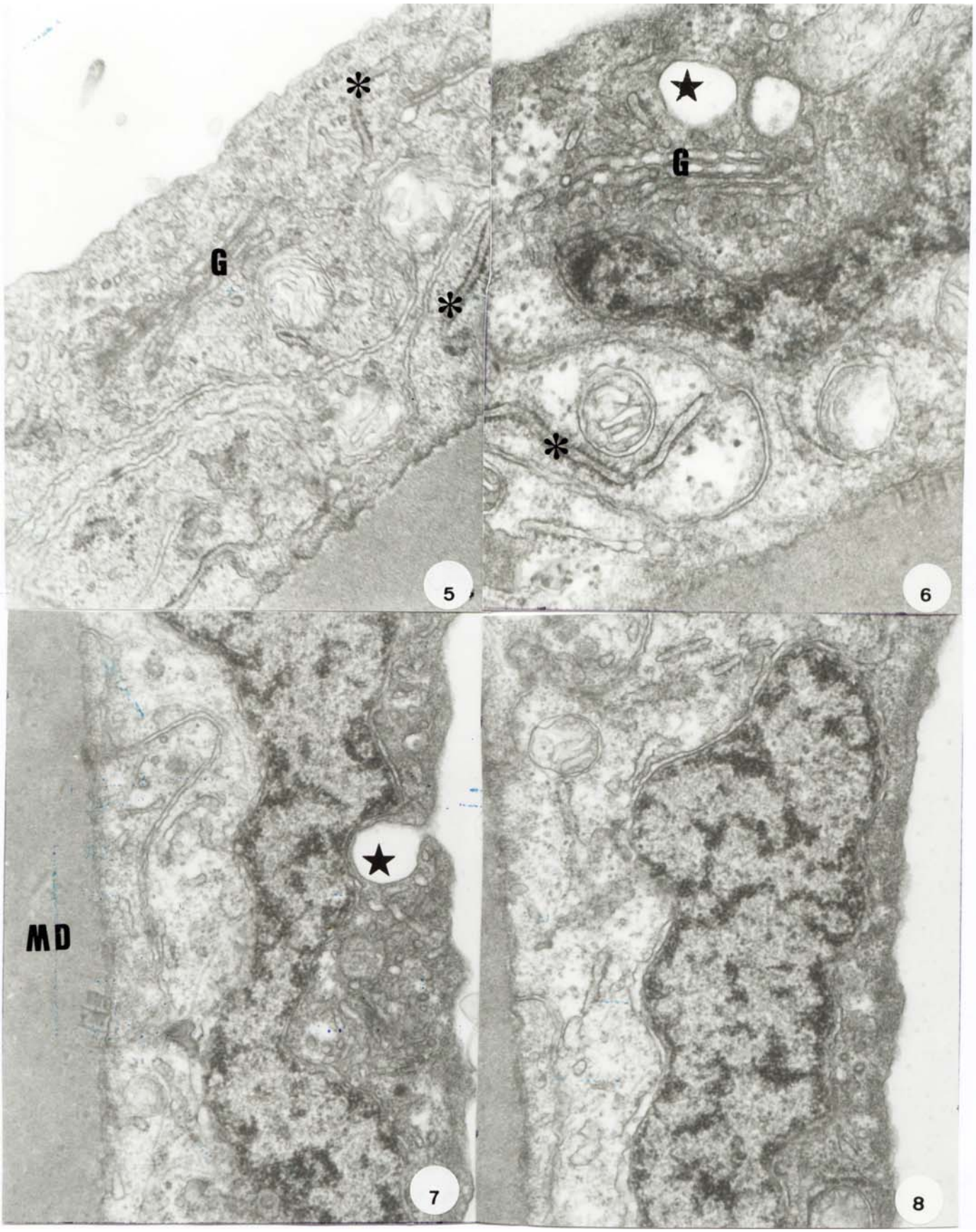
GC M2

Figura 5 – Citoplasma rico em vesículas. Golgi (G). Retículo endoplasmático (*) (X31500).

Figura 6 – Vacúolos de conteúdo elétron – transparente (estrela). Golgi (G). Retículo endoplasmático (*) (X42000).

Figura 7 – Imagem sugestiva de macropinocitose (estrela) na superfície celular. Membrana de Descemet (MD) (X31500).

Figura 8 – A porção basal da célula possui discreta rarefação citoplasmática (X31500).


G
5
G
6
MD
7
8

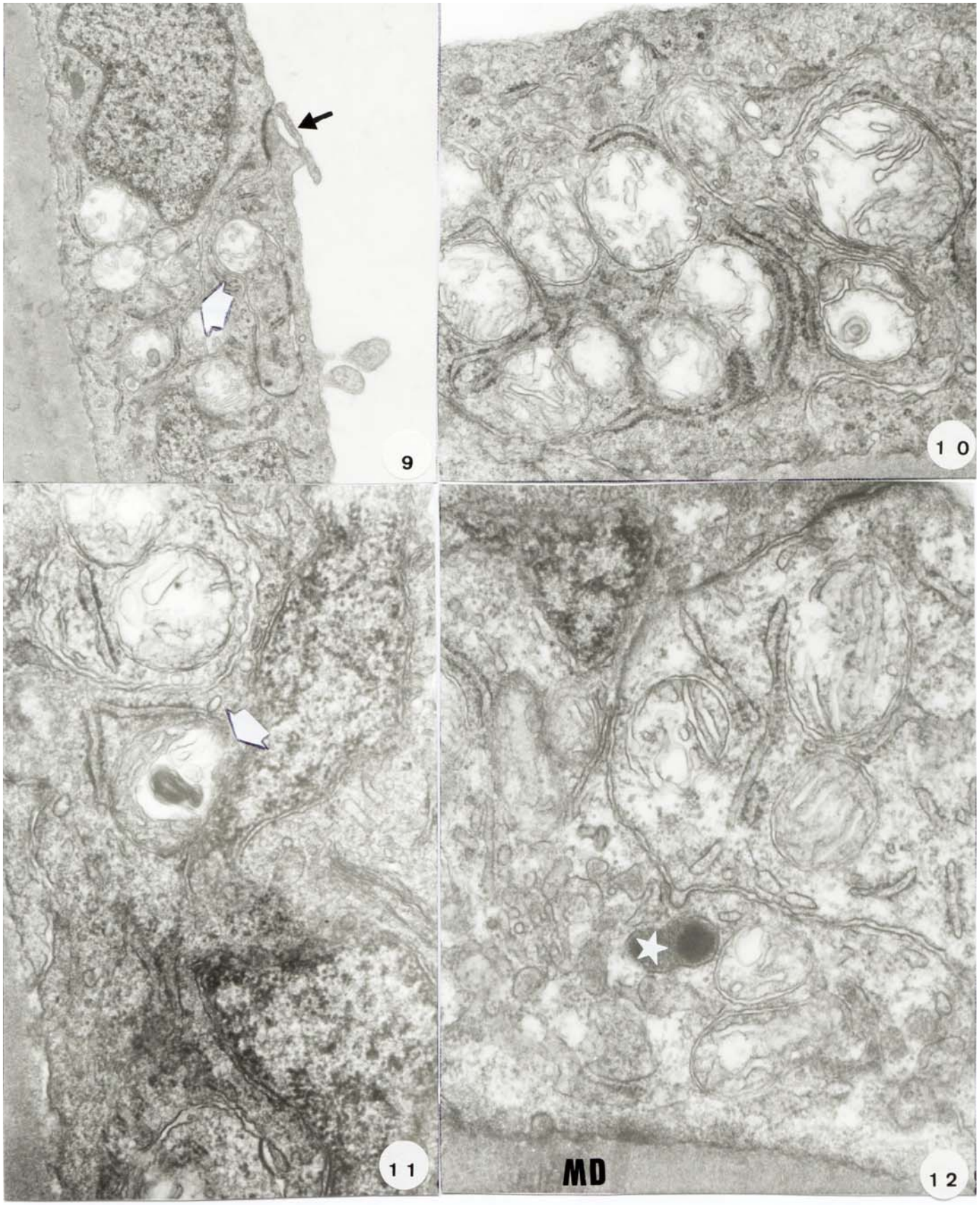
GC M3

Figura 9 – Na região de união entre células endoteliais corneais existem projeções filopoidais (seta). No ápice celular há junções selantes e o relacionamento entre células se dá de forma oblíqua (seta grossa branca)(X13250).

Figura 10 – Componentes citoplasmáticos de célula endotelial corneal (X31500).

Figura 11 – Presença de corpos densos e figuras de Mielina no interior de mitocôndrias alteradas (seta larga branca)(X42000).

Figura 12 – Vacúolo (estrela branca) contendo material com elétron – densidade semelhante à Membrana de Descemet (MD) (X42000).


9
10
11
MD
12

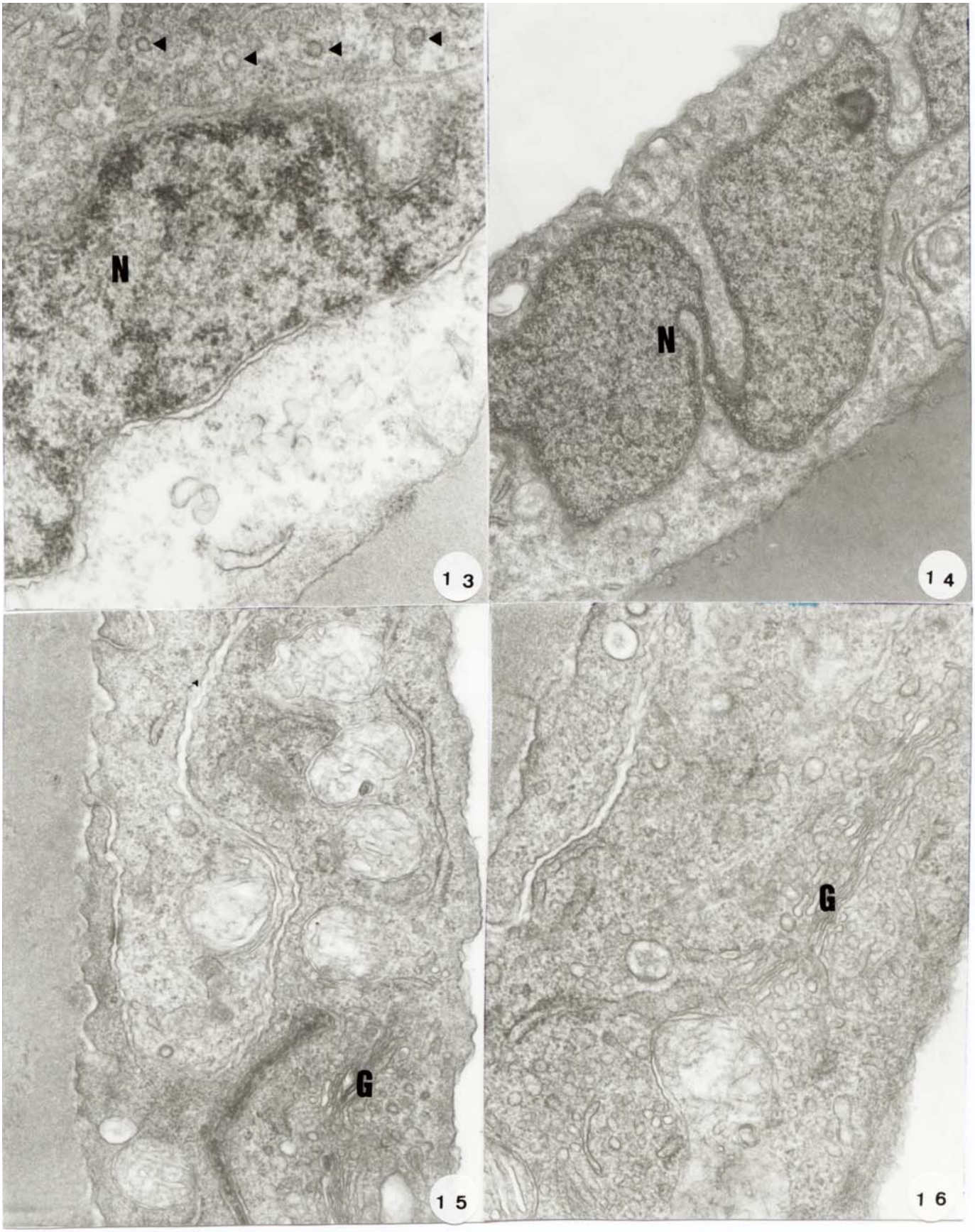
GD M2

Figura 13 – Aumento das vesículas citoplasmáticas (ponta de seta) na porção superior ao núcleo (N) celular e rarefação citoplasmática na porção basal da célula (X42000).

Figura 14 – Comparar o núcleo celular com o da figura 13. Nesta fotomicrografia o núcleo (N) a cromatina está descondensada e há nucléolo evidente (X17000).

Figura 15 – Aumento de vesículas citoplasmáticas e alterações mitocondriais. Golgi (G) (X31500).

Figura 16 – Aparelho de Golgi (G) e aumento das vesículas citoplasmáticas (X42000).


N
13
N
14
G
15
G
16

GD M2

Figura 17 – Alterações mitocondriais (m) e acúmulo de ribossomos livres (X31500).

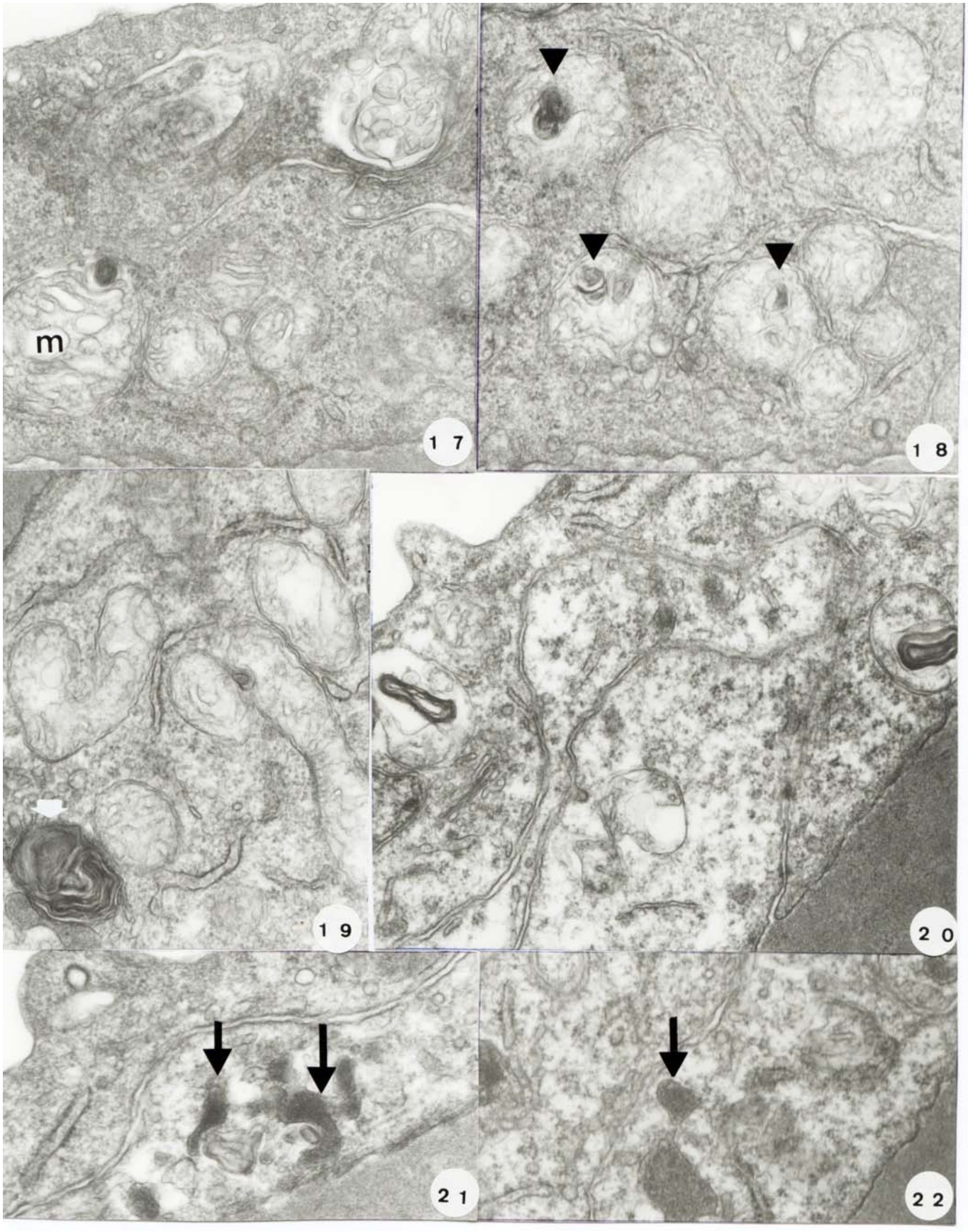
Figura 18 – As pontas de seta realçam as mitocôndrias com ausência de cristas e ocupadas por figuras de mielina e corpos densos (X42000).

Figura 19 – Figura de mielina ocupando o interior de mitocôndria (seta branca) (X42000)

Figura 20 – Corpos densos, acúmulos de ribossomos livres e rarefação do citosol em célula endotelial corneal (X31500).

Figura 21 – Rarefação citoplasmática na porção basal da célula, onde também se observa a presença de vacúolos contendo substância de elétron - densidade semelhante à membrana de Descemet (seta) (X31500).

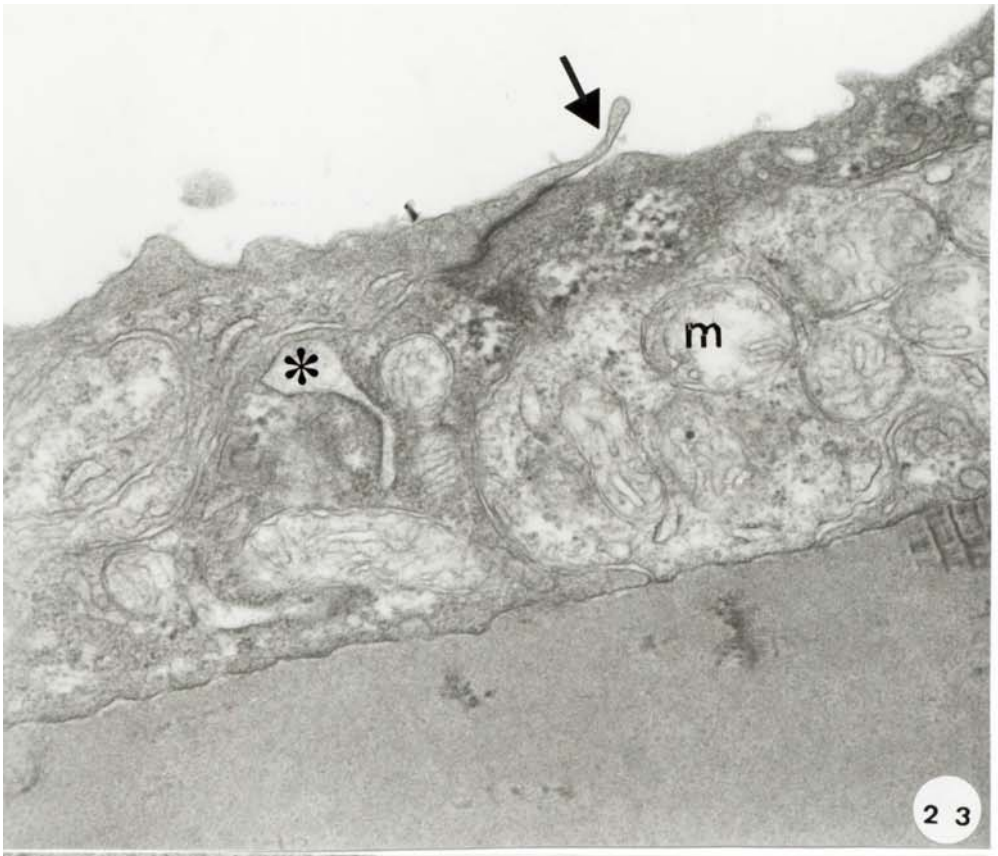
Figura 22 – Detalhe de substância elétron - densa dentro de vacúolo citoplasmático (seta) (X42000).

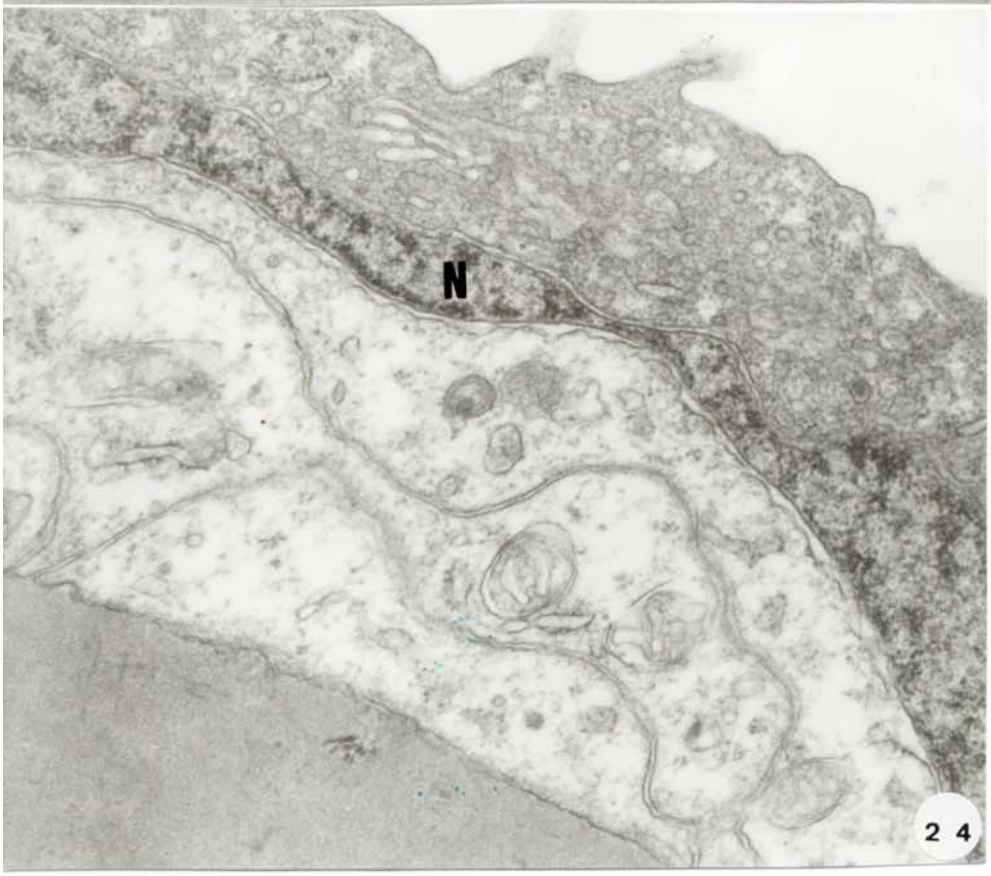

m
17
18
19
20
21
22

GD M2

Figura 23 – O retículo endoplasmático (*) está dilatado e as mitocôndrias (m) com alterações das cristas mitocondriais. Observar projeção filopoidal no ápice da célula, junto a união entre células (X31500).

Figura 24 – Intensa rarefação citoplasmática na porção basal da célula. Núcleo (N) (X42000).


m
*
2 3


N
2 4

GD M3

Figura 25 – Houve descondensação da cromatina nuclear, rarefação do citosol e aumento das vesículas citoplasmáticas (X31500)

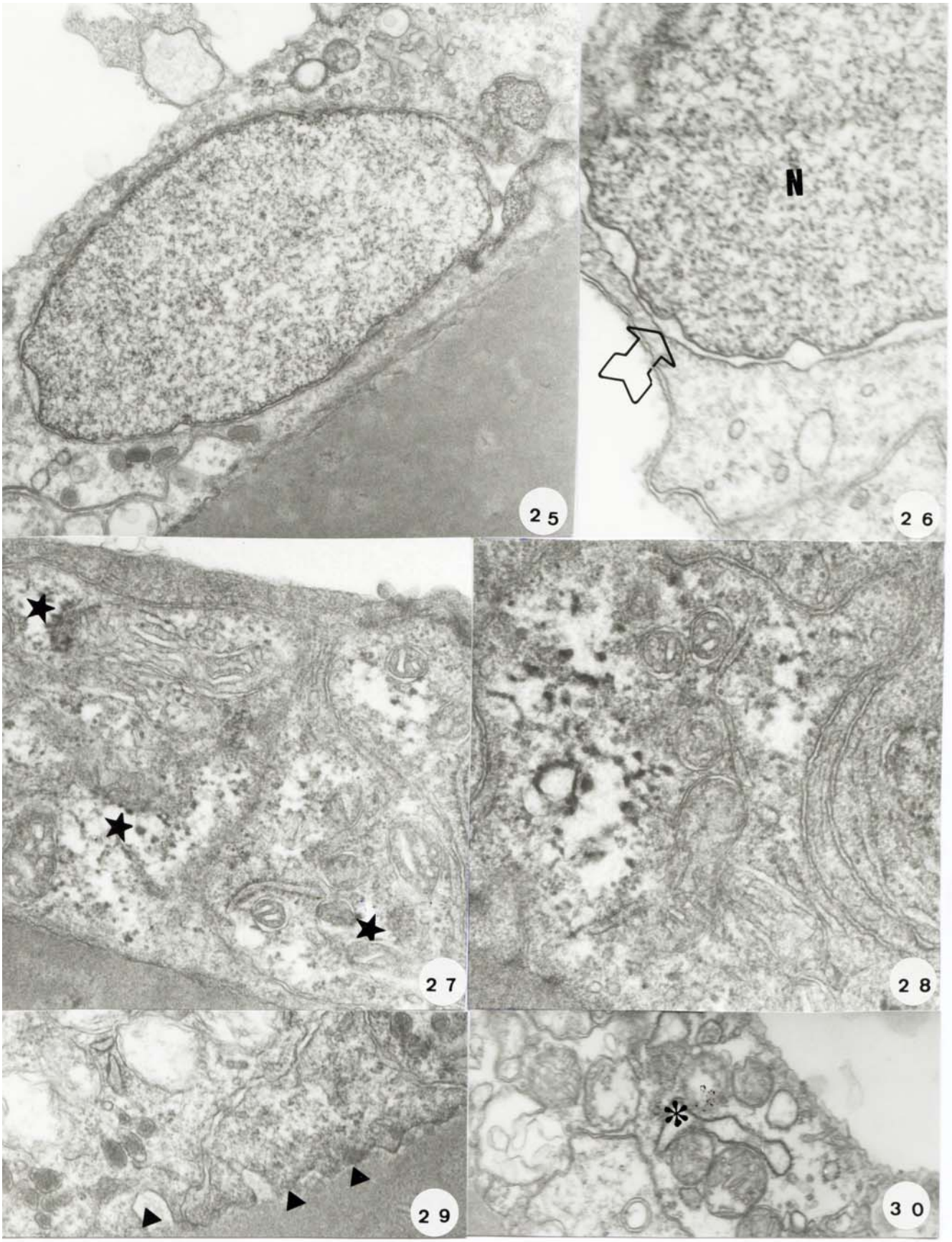
Figura 26 – Observar a separação da membrana nuclear(seta), com a presença de espaços irregulares na carioteca. Núcleo (N) (X42000).

Figura 27 – No citoplasma, imagens elétron - densas circulares em meio a rarefação do citosol (estrela) que podem ser interpretadas como grânulos de glicogênio extraídos durante a preparação do material para exame (X31500).

Figura 28 – Detalhe das imagens elétron - densas circulares em meio a rarefação do citosol (X42000).

Figura 29 – Na porção basal da célula, aumento de saliências e reentrâncias entre o endotélio e a membrana de Descemet (ponta de seta) (X42000).

Figura 30 – Retículo endoplasmático dilatado(*) (X13250).


25
N
26
27
28
29
30

GD M3

Figura 31 – Citoplasma de célula endotelial corneal com alterações nas organelas (X17000).

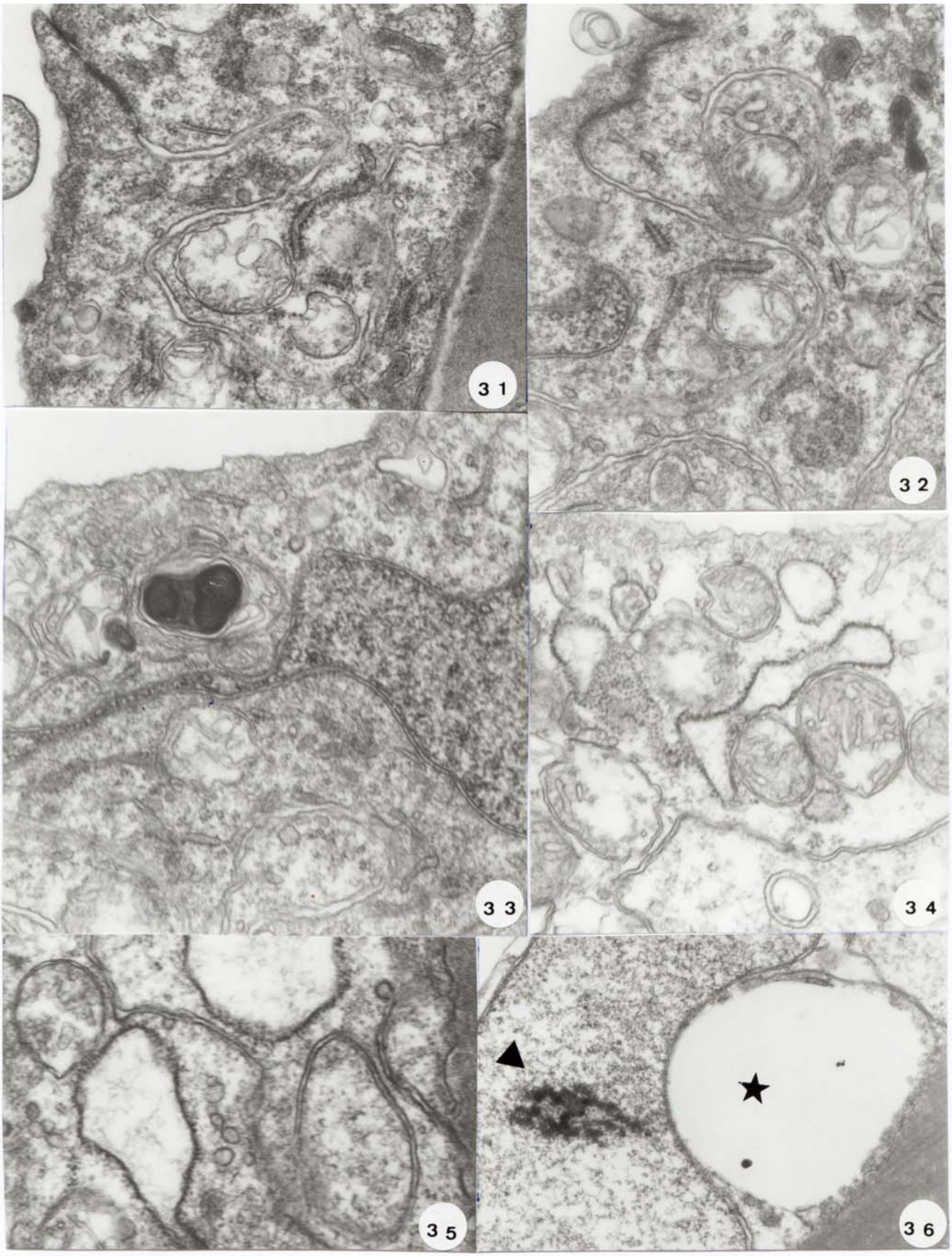
Figura 32 – Os vacúolos contendo substância elétron - densa estão distribuídos por todo o citoplasma (X42000).

Figura 33 – Citoplasma de célula endotelial corneal contendo corpos densos e aumento de ribossomos livres (X31500).

Figura 34 – Citoplasma de célula endotelial corneal com dilatação de retículo endoplasmático (X42000).

Figura 35 – Dilatação de retículo endoplasmático (X23000).

Figura 36 – Enorme vacúolo (estrela) na porção basal da célula. Núcleo com cromatina descondensada e nucléolo(ponta de seta) (X31500).


31
32
33
34
35
36

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

1. QUANTO AO MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO

Um grande problema no estudo experimental das alterações oculares desencadeadas pelo diabetes tem sido a escolha do modelo animal adequado, aquele que reproduza as lesões oculares semelhantes as encontradas no homem.

Com os avanços tecnológicos, os estudos experimentais são de grande valia para o conhecimento da doença e de seus estágios evolutivos, assim como para se conhecer o efeito de drogas terapêuticas.

Dos vários animais utilizados como modelo experimental, alguns desenvolvem diabetes espontaneamente, como o rato BB Wistar, o cão Heeshond, a macaca Nigra e algumas raças de hamsters e de camundongos (Mordes & Rossini, 1981).

A doença pode também ser induzida em animais de várias maneiras, por exemplo, por meio de “stress”, infecção, toxinas, pancreatectomia, lesões do sistema nervoso central, uso de hormônio anti insulínicos (Mordes & Rossini, 1981), exposição a hidrocortisona ou hormônio adreno-corticotrófico (Cavallero & Mosca, 1953), indução por vírus (Yoon et al., 1979) e uso de agentes beta-citotóxicos (Dunn et al., 1943.; Rakieten et al ., 1963; Mordes & Rossini, 1981).

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

Os cães desenvolvem lesões morfológicas semelhantes às humanas (Frank, 1989). Alterações oculares demoram cerca de 5 anos para se manifestar, elevando muito o tempo e o custo do experimento (Tilton et al., 1986).

O coelho é um importante animal usado nos experimentos laboratoriais; desenvolve, por exemplo, alterações corneanas, como espessamento corneal e hidratação do endotélio. Entre eles se destaca a espécie New Zealand (Herse, 1990).

Outros roedores são destaque, entre eles, as espécies BB Wistar, a Sprague-Dawley e a Long Evans. O rato Wistar, utilizado no presente experimento, possui a cabeça maior e mais curta, quando comparado as outras variedades e presta-se bem a pesquisa experimental (Harkness & Wagner, 1993), apesar de não desenvolver todas as lesões oculares encontradas no diabetes humano (Health, 1970; Engerman et al., 1982; Tilton et al., 1986).

As críticas quanto ao uso de ratos como modelos experimentais, estão relacionadas ao fato destes animais apresentarem

alterações que não são exatamente iguais as que são observadas em humanos. Os ratos não desenvolvem microaneurismas na retina em conseqüência do estado diabético (Schellini, 1992). No entanto, parece ser um bom modelo animal para o estudo do diabetes, em decorrência das seguintes vantagens:

- fácil manuseio (alimentação, higiene e acomodação);

- ciclo biológico curto (aproximadamente 2 anos) o que permite obtenção de alterações crônicas e degenerativas em pouco tempo;

- ocupa pouco espaço, possibilitando o trabalho simultâneo com vários grupos experimentais;

- custo financeiro baixo.

Além do uso de ratos como modelo experimental, há críticas quanto ao uso de aloxana para indução do diabetes experimental, mas o seu emprego se justifica pela experiência já desenvolvida com este método.

A aloxana é um derivado do ácido úrico e encontra-se, em geral, na forma de mono-hidrato de aloxana. Foi descoberta por Dunn et al. (1943), que durante estudo feito sobre os efeitos do ácido úrico em rins de coelho, observaram que a aloxana causava destruição das células beta-pancreáticas.

Embora evidências predominantes sejam que a aloxana cause diabetes por efeito tóxico direto sobre as células beta, o local e o

mecanismo exato da sua ação não são completamente conhecidos (Bell et al., 1983).

Além de ser uma droga bastante eficaz (Orloff et al., 1975) a aloxana já foi utilizada nos estudos anteriores feitos pelo Grupo de Estudo do Diabetes Experimental da Universidade onde o presente estudo foi desenvolvido.

Assim, as diversas variáveis no uso desta droga, como a dose a ser utilizada, a necessidade de jejum antes de sua aplicação, via a ser utilizada para injeção e o sistema utilizado para aplicações já estão conhecidas (Macedo et al., 1981, 1985, 1986, 1987; Spadella, 1989; Brein, 1990; Schellini, 1992; Jorge, 1996).

Os estudos anteriores mostraram, também, que existe a necessidade de controles clínicos e bioquímicos para o acompanhamento dos animais uma vez que, após a injeção da droga pode não ocorrer a indução da doença, pode haver a morte do animal por doença extremamente grave, ou se instalar a doença diabética apenas por certo período, principalmente próximo à indução, com a posterior regressão espontânea do estado diabético (Spadella, 1989). Justifica-se, assim, a necessidade absoluta de seguimento laboratorial, a fim de se assegurar que realmente se os animais estudados são portadores de diabetes grave e que a doença persiste ao longo de todo experimento.

O tempo de seguimento dos animais também foi determinado por observações anteriores. A primeira observação (M1), se

deu 15 dias após a indução do diabetes pela aloxana, período necessário para confirmação do quadro e da intensidade do diabetes induzido, homogeneizando os grupos de estudo (Spadella, 1989; Schellini, 1992).

A segunda observação ocorreu no momento M2, onde parte dos ratos dos grupos GC e GD foram sacrificados, 1 mês após a constituição dos grupos experimentais. Este momento experimental foi determinado com a finalidade de analisar as alterações do diabetes no endotélio corneal na fase inicial da doença.

A terceira observação ocorreu em M3, onde outros animais do GC e GD foram sacrificados após 12 meses do início do seguimento dos ratos. Segundo Schellini (1992), este é o período suficiente para produzir alterações retinianas significativas, secundárias ao diabetes induzido experimentalmente, tendo sido por este motivo, o tempo escolhido para que fossem observados fenômenos tardios, relacionados a doença diabética.

Acompanhamento maior que o que foi realizado neste estudo é bastante difícil quando se trabalha com animais diabéticos, em decorrência da alta taxa de mortalidade, o que torna tarefa árdua mantê-los vivos por mais de um ano e meio (Frank 1989).

2. QUANTO AOS RESULTADOS OBTIDOS

2.1. AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL

A avaliação dos parâmetros clínicos e laboratoriais foi importante para que se constatasse a ocorrência da doença diabética nos animais do estudo, assim como a manutenção do estado diabético no decorrer do período de observação, devido a possibilidade de ocorrer regressão espontânea do estado diabético ou ainda a não indução do quadro diabético (Spadella, 1989).

2.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS

Os parâmetros utilizados para se avaliar a evolução clínica dos animais foram: o estado geral, peso, diurese, ingestão hídrica e alimentar.

Assim, a doença foi constatada nos animais do GD pelo comportamento dos animais, como já foi descrito em estudos anteriores (Spadella, 1989; Schellini, 1992).

O peso dos animais do grupo controle sofreu um discreto aumento durante o período de acompanhamento, o que era esperado, pois os animais estavam saudáveis. A perda de peso em animais diabéticos quando comparados aos do GC foi bastante importante e

similar a dados da literatura que mostram perda aguda e acentuada de peso no diabetes (Orloff, 1975; Ueda, 1979; Macedo et al., 1981, 1986; Clarson, 1986; Spadella, 1989; Brein, 1990).

A diurese acentuada (poliúria), uma das características do estado hiperglicêmico, também foi observada nos animais diabéticos e significativamente mais elevadas quando comparada aos do GC e ocorre quando a elevada concentração de glicose no filtrado glomerular excede a capacidade das células tubulares em reabsorvê-las, dando origem a diurese osmótica, e produzindo grande volume de urina, devido a elevação da osmolaridade (Felig & Bergman, 1998; Scherwin, 2000).

O estado diabético é provocado por altos níveis de glicose sanguínea, o que desencadeia um quadro de hiperosmolaridade, com passagem de água do meio intracelular para o extracelular, com o intuito de que seja mantido o equilíbrio osmótico. Ocorre, então, a desidratação intracelular que é percebida pelos osmo-receptores cerebrais, desencadeando sede intensa e polidipsia. Neste experimento, a ingestão hídrica dos animais do GD foi significativamente superior à observada no grupo controle, nos dois momentos experimentais.

2.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Completando os parâmetros necessários para a caracterização da amostra, os resultados bioquímicos também foram importantes para a definição da presença do estado diabético.

Os ratos do grupo controle não apresentaram glicosúria e mantiveram valores de glicemia compatíveis com os observados em animais normais, da mesma espécie (Orloff et al., 1975; Ueda et al., 1979; Macedo et al., 1986).

Os animais do grupo diabético, apresentaram níveis glicêmicos elevados e glicosúria, decorrentes do diabetes grave, induzido pela aloxana. É importante salientar que indivíduos diabéticos apresentam flutuações glicêmicas relacionadas com a ingestão alimentar, “stress”, infecções, etc, estando estas flutuações presentes também no animal.

Neste estudo os níveis de glicose urinária foram diferentes, comparando grupo controle e diabético, nos dois momentos experimentais. A glicosúria ocorre com freqüência no diabetes (Clarson et al., 1986; Scherwin, 2000). Apesar disso, no presente estudo, pode ser também devida a nefrotoxidade direta da aloxana sobre os túmulos renais (Spadella, 1989).

3. QUANTO A AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

Conforme referido anteriormente, a córnea de ratos, semelhantemente a córnea humana, é formada por epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio (Hogan et al., 1971; Mordes & Rossini, 1981).

À microscopia óptica, não é possível observar alterações morfológicas no endotélio corneal, uma vez que as alterações estão localizadas no nível de organelas intracitoplasmáticas e do núcleo celular.

Assim, à microscopia eletrônica, tanto a de varredura, como a de transmissão, é que pode fornecer subsídios para o estudo, tendo sido possível observar alterações nos animais diabéticos, em relação aos dos grupos controle.

Observou-se que o endotélio é composto por células dispostas em camada única e envoltas por membrana plasmática que mantém estável a composição molecular e a estabilidade iônica; e contém núcleo alongado, com cromatina condensada e citoplasma rico em organelas, da mesma forma que existe em olhos humanos (Hogan et al., 1971).

Todas as membranas plasmáticas possuem estrutura básica semelhante, constituída por bicamadas lipídicas com moléculas protêicas inseridas, fazendo saliências numa ou nas duas faces da membrana. A face externa é rica em glicoproteinas, enquanto a face interna, voltada

para o lado citoplasmático, apresenta proteínas unidas aos filamentos do citoesqueleto celular. Esta disposição, facilita a troca de moléculas entre as células, as vezes sem gasto de energia (difusão passiva) ou às custas de energia (transporte ativo) (Bretscher, 1985).

Apesar de não se ter usado meios específicos para avaliação das uniões entre células no presente estudo, pode-se observar que as células do endotélio da córnea dos ratos, assim como ocorre no endotélio corneal humano, estão unidas entre si por vários tipos de uniões que existem entre as paredes laterais.

Dentre os múltiplos complexos de união, entre as células, existem a *zonula ocludens* ou zona de oclusão, também chamada de vedação. A *zonula ocludens* se localiza já no início da união entre células, impedindo a entrada de íons no espaço entre as células e demonstrando que a passagem de substâncias da câmara anterior para a córnea se dá por meio da transporte trans-citoplasmático (Bretscher, 1985).

A presença da chamada *macula aderens*, ou zonula aderente, é a que, entre as células, permite a união estável através de material amorfo na face citoplasmática de cada membrana celular onde se inserem microfilamentos de actina que fazem parte do citoesqueleto. Estas placas, também chamadas de desmossomos, são sensíveis aos íons cálcio, sendo desorganizadas quando a concentração deste íon é baixa, o que acarreta a separação das células (Bretscher, 1985).

Além destas uniões, existem muitas interdigitações entre células adjacentes, o que aumenta a área de contacto entre células vizinhas e facilita trocas (Hogan et al., 1971).

O contacto entre células endoteliais corneais se dá de forma oblíqua, tanto nos ratos, como em outros animais, inclusive no homem (Hogan et al., 1971). Esta disposição característica destas células é muito interessante e, apesar de não enfatizada nos estudos que nos precederam, deve ser uma forma de dificultar o ingresso de substâncias presentes na câmara anterior para dentro da córnea, uma vez que a pressão intra-ocular positiva, tenderia a levar substâncias para dentro da célula.

No interior da célula endotelial do GC, observou-se o núcleo ovalado, contendo cromatina em grande quantidade. No ser humano estas células não possuem o fenômeno de mitose e, com o tempo, o núcleo diminui de tamanho, coincidindo com a morte celular (Junqueira & Carneiro, 1997).

O citoplasma é rico em organelas, entre elas, as mitocôndrias que são as responsáveis pela produção de energia necessária para manutenção da transparência corneal; localizam-se próximo ao núcleo; são longas e apresentam cristas orientadas longitudinalmente, como foi possível observar.

Outras importantes organelas estão presentes no citoplasma da célula endotelial corneal, como o reticulo endoplasmático

rugoso e liso, o complexo de Golgi bem desenvolvido, ribossomos livres, lisossomos e corpos multivesiculares, estes derivados da digestão intra-celular enzimática (Bretscher, 1985).

Vesículas pinocitóticas foram encontradas próximo às membranas plasmáticas e também no citoplasma mais interno; provavelmente as vesículas são o resultado da invaginação sofrida pela membrana citoplasmática, captando material da câmara anterior ou da Membrana de Descemet, e direcionando-o para as células estromais ou para a câmara anterior, às custas de energia produzida pelas mitocôndrias.

De modo geral, as células endoteliais e seus constituintes foram semelhantes nos dois momentos experimentais, quando analisados os ratos normais (GC), não havendo diferença quanto ao aspecto ou quanto aos componentes celulares, exceto pela aparente presença de quantidade maior de organelas digestivas nos animais do M3. A presença de corpos densos e figuras de Mielina dentro de vacúolos opticamente vazios, pode estar relacionada ao processo de envelhecimento e morte celular que ocorre no transcorrer da vida, sendo mais facilmente encontrados em animais mais velhos.

Vários fatores influenciam a função celular entre eles: drogas, radiações ionizantes (raio X, radioatividade, raios ultra-violeta), infecções virais, doenças endócrinas, entre elas, o diabetes.

Provavelmente este foi o fator que nos levou a observar, nos animais diabéticos, diferenças nas células endoteliais, quando comparadas com as células de ratos normais, alterações presentes tanto no núcleo, como nas organelas citoplasmáticas.

O núcleo celular em animais diabéticos apresentou alterações do seu envoltório, com espaçamento das membranas nucleares, sinal evidente de que vai ocorrer desequilíbrio da função celular, uma vez que é o núcleo que comanda toda a atividade celular.

Apoptose é o fenômeno caracterizado por compactação da célula, incluindo núcleo e citoplasma e, sendo verificado ao microscópio, que o núcleo aparece mais condensado e escuro. Nas fases iniciais as organelas não sofrem modificações, porém, com a evolução do processo, ocorre fragmentação e fagocitose pelas organelas responsáveis por manter o citoplasma livre de detritos, organelas estas que são os lisossomos ou os corpos densos (Lee et al., 1993). Após a digestão, restam os vacúolos vazios. Por não haver ruptura da membrana plasmática, o conteúdo intra-celular não é lançado no meio extra-celular permanecendo no interior do citoplasma, como vacúolos opticamente vazios.

As alterações presentes em ratos diabéticos poderiam ter esta interpretação, havendo, assim, alterações nucleares e citoplasmáticas que fariam parte da morte celular programada em decorrência do descontrole metabólico.

Alterações na superfície de contacto entre as células endoteliais e a membrana de Descemet, tais como maior quantidade de saliências e reentrâncias existentes entre as duas camadas, foi observada nos animais diabéticos, principalmente nos do GDM3. A célula endotelial, quando estimulada por inflamação, traumatismo e alterações genéticas, pode produzir um “excesso” de lâmina basal anormal, dando lugar ainda, ao espessamento desta membrana (Rehany et al., 2000).

A gênese das alterações observadas nos animais diabéticos poderia estar relacionada com a exposição das células endoteliais a altos níveis de glicose, presentes no humor aquoso e nos vasos que nutrem a córnea periférica.

O endotélio corneal do rato, como o de humanos, apresenta grande quantidade de mitocôndrias, organela responsável por grande parte da energia necessária para que o endotélio mantenha a transparência corneal.

No presente estudo foi possível observar que esta organela apresentou-se bastante alterada nos animais do GD, havendo poucas com morfologia semelhante a que foi observada nos animais normais. Assim, as mitocôndrias dos animais diabéticos apresentaram mudanças na forma (mais redondas), edema e diminuição das cristas. Por serem estas organelas bastante importantes na produção de energia para a célula, estes achados podem sugerir a falência do sistema responsável pela produção de energia celular. Desconhece-se qual seria o mecanismo

que provoca a morte desta estrutura; porém, as conseqüências deste efeito no endotélio e, posteriormente, em outras porções da córnea, é um fato.

Comparando animais normais em seus dois momentos, com os do GD em seus respectivos momentos, foi possível observar aumento de corpos densos no citoplasma endotelial de animais do GD. Este fato evidencia processo aumentado de degeneração das organelas citoplasmáticas, já que as mesmas estão envolvidas na remoção de detritos celulares. Em outro estudo, também foi observado presença de corpos densos aumentados em epitélio pigmentar da retina de ratos diabéticos aloxânicos (Schellini, 1992; Jorge, 1996).

O endotélio corneal, quando exposto a altos níveis de glicose e sob efeito osmótico, para manter o equilíbrio (Lei de Gibbs-Donnan), capta água, havendo edema intracelular. O edema afeta também as organelas intracitoplasmáticas, fato evidenciado nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático , observados com características sugestivas de portadores de edema, nos animais diabéticos.

A rarefação citoplasmática, observada principalmente em animais diabéticos no M3 e localizada principalmente na região da base celular, próximo da membrana de Descemet, associada à presença de numerosas vesículas, principalmente nos animais do GDM3 poderia, ainda, ser indicio de edema intracitoplasmático ou de que muitas

organelas citoplasmáticas desapareceram desta região e que a célula inicia um processo de falência. Schellini (1992) observou fenômeno semelhante, estudando pericitos da retina em ratos diabéticos e chamou de “célula fantasma”, uma célula na qual se observou com nitidez seu envoltório, estando seu conteúdo ausente, interpretando este fato, como a observação de uma célula inativa.

A presença de corpos multivesiculares, vacúolos eletron-transparentes, contendo figuras de Mielina, imagens sugestivas de grânulos de glicogênio, também são indicativos de falência celular. O acúmulo de corpos densos, corpos multivesiculares e figuras de Mielina foi mais acentuado nos animais diabéticos, a ponto de animais de M2 já apresentarem quantidade semelhante destas organelas que os animais normais de M3, animais estes com 12 meses de vida a mais que os do M2. Este fato nos mostra que a exposição a hiperglicemia afetou a integridade celular, promovendo degeneração mais precoce de organelas citoplasmáticas.

Altos níveis de glicose podem penetrar nas células endoteliais corneais durante momentos de hiperglicemia, como no diabetes descontrolado. As concentrações elevadas de glicose intra-celular fazem com que a aldose redutase produza aumento significativo na quantidade de Sorbitol, o qual, diferentemente da glicose, não pode atravessar eficientemente as membranas celulares e, assim, permanece armazenado dentro da célula. Como resultado, o Sorbitol se acumula

nestas células, causando forte efeito osmótico e, posteriormente, edema celular, devido à retenção de água. A sobrecarga endotelial desencadeia quadro de edema córnea (Schultz et, al., 1984; Herse, 1990; Larsson et, al., 1996).

Outra condição também responsável pela quebra da homeostase corneal, secundária a deprivação de oxigênio advém do metabolismo anaeróbico. O acúmulo de ácido láctico intra-celular por mudança de gradiente de concentração, atrai e acumula água, desencadeando edema local (Saini & Mittal, 1996; Ziad et al., 2002). Em condições de equilíbrio, ou seja, pH neutro, os lisossomos não apresentam atividade; porém, em condições de acidose citoplasmática, os lisossomos são ativados, liberando seu conteúdo e destruindo organelas adjacentes.

A comparação de ratos diabéticos de M2 e M3, mostrou que as alterações encontradas no início da exposição à descompensação metabólica se acentuaram com o transcorrer do período experimental, uma vez que, animais diabéticos de M3 tiveram mais alterações que os do M2.

Assim, a comparação dos achados dos animais diabéticos do M2, em relação aos diabéticos do M3, mostrou que as lesões ocorrem tanto no núcleo, como no citoplasma, são evolutivas e que se acentuam com a manutenção da descompensação metabólica.

As mudanças na ultra-estrutura corneal devem refletir o que se passa na bioquímica celular, comprometendo desde a morfologia, até a fisiologia deste importante componente da refração do olho.

Portanto, o presente estudo mostrou que o endotélio corneal de ratos sofre alterações em decorrência do estado diabético e que estas alterações são mais freqüentes e importantes quando o animal é diabético há mais tempo.

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

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Perante as condições experimentais empregadas, observou-se que:

- As células endoteliais corneais de ratos normais do GCM3 apresentam discretas diferenças ultra-estruturais quando comparadas com as do GCM2;
- As células endoteliais corneais de animais do GC diferem das do GD, tanto no M2, como no M3;
- O endotélio corneal dos animais do GDM3 apresentam maior intensidade de alterações morfológicas que os do GDM2.

Assim, pode-se concluir que o diabetes provoca alterações ultra-estruturais em células endoteliais de córnea e que estas alterações possuem caráter evolutivo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

Aiello LM, Cavallerano JD. Ocular complications of diabetes mellitus. In: Kahn CR, Weir GC, editors. Joslin´s diabetes mellitus. 13 rd ed. Baltimore: Willians & Wilkins; 1994. p.771-93.

Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a WHO consultation. Diabet Med 1998;15:539-53.

American Diabetes Association. Diabetic nephropathy. Diabetes Care 2001a;24 suppl1: S69-S72.

American Diabetes Association. Guide to diagnosis and classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Diabetes Care 1997; 20 suppl1: S21-7.

American Diabetes Association. Gestational diabetes mellitus. Diabetes Care 2001b;24 suppl1: S77-9.

American Diabetes Association. Hyperglycemic crises in patients with diabetes mellitus. Clin Diabetes 2001c;19:82-90.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. N Engl J Med 1997; 336:309-15

American Diabetes Association The Expert Committee on The Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on 0the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2001;24 suppl1:S5-20.

Arduino F. O diabetes através dos tempos: marcos fundamentais da história da doença. In: Arduino F, Duque FLV, Rodrigues J. Diabetes mellitus e suas complicações. Rio de Janeiro: Atheneu; 1962. p.1-6.

Asociacion Latinoamericana de Diabetes – ALAD. Guias ALAD 2000 para el diagnostico y manejo de la diabetes mellitus tipo 2 con medicina basada en evidencia. [S.L.]: ALAD;2000a. Epidemiologia de la diabetes tipo 2 em Latinoamerica;cap.1. [citado 2002 mar 18]. Disponible em: URL: http://www.alad.org/guiasalad/guiacap1.html.

Asociacion Latinoamericana de Diabetes – ALAD. Guias ALAD 2000 para el diagnostico y manejo de la diabetes mellitus tipo 2 con medicina basada en evidencia. [S.L.]: ALAD;2000b complicaciones oftamológicas; cap.10. [citado 2000 mar 18]. Disponível em: URL: http://www.alad.org/guiasalad/guiacap10.html.

Bell RH Jr, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. J Surg Res 1983;35:433-60..

Benson WE. Diabetic retinopathy. In: Tasman W, Jaeger EA, editors. Duane´s clinical ophthalmology [monograph on Cd-Rom] Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998.

Bosso EP. Alterações morfológicas no estroma do corpo ciliar de ratos normais e diabéticos aloxânicos [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2002.

Bandello F, Brancato R, Lattanzio R, Galdini M, Falcomata B. Relation between iridopathy and retinopathy in diabetes. Br J Ophthalmol 1994; 78:542-5.

Breim LC. Estudo comparativo entre o transplante total de pâncreas, transplante de Ilhotas de Langerhans, e o tratamento convencional com insulina no controle das manifestações clínicas do diabetes aloxânica no rato [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 1990.

Bresnick GH, Engerman R, Davis MD, Venecia G, Myers FL. Patterns of ischemia in diabetic retinophathy. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol 1976;81:OP694-709.

Bretscher MS. The molecules of the cell membrane. Sci Am 1985; 253:100-8.

Cavellero C, Mosca L. Mitotic activity in the pancreatic islets of the rat under pituitary growth hormone and adrenocorticotropic hormo treatment. J Bacteriol 1953;66:147-51.

Clarson C, Daneman D, Martin J. Subclinical diabetes mellitus in the BB rat. Diabetes Res 1986;3:237-40.

Datiles MB, Kador PF, Kashima K, Kinoshita JH, Sinha A. The effects of sorbinil, an aldose reductase inibidor, on the corneal endothelium in galactosemic dogs. Invest Ophthalmol Vis Sci 1990;31:2201-4.

Dohlman CH, Hedbys BO, Mishima S. The swelling pressure of the corneal stroma. Invest Ophthalmol Vis Sci 1962;1:158.

Dubowiski CS. An ortoluidine method for body-fluid glucose determination. Clin. Chem. 1962. v.8, p.215-35.

Duke-Elder S, Dobree JH. Metabolic diseases: diseases of the carbohydrate metabolism: diabetes mellitus. In: Diseases of the retina. London: Henry Kimpton; 1967. v10, p. 408-48.

Dunn JS, Sheehan HL, McLetchie NGB. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. Lancet 1943;1:484-7.

Engerman R, Finkelstein D, Aguirre G, Diddie KR, Fox RR, Frank RN, Varma SD. Ocular complications. Diabetes 1982;31(suppl1Pt2):82-8.

Felig P, Bergman M. The Endocrine pancreas: diabetes mellitus. In: Felig P, Baxter JD, Frohman LA, editors. Endocrinology and metabolism. New York: Mcgraw-Hill; 1998. p.1107-250.

Foster D W. Diabetes mellitus. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kaper DL, et al., editors. Harrinson´s principles of internal medicine. 14th ed. New york: McGraw-Hill; 1998. p.2060-81.

Frank RN. Etiologic mechanisms in diabetic retinopathy. In: RYAN SJ, editor. Retina St. Louis: Mosby; 1989. p.301-26.

Fryczkowski AW, Hodes BL, Walker J. Diabetic choroidal and iris vasculature scanning electron microscopy findings. Int Ophthalmol 1989; 13:269-79.

Gibbs G, Wilson R, HO CK. Experimental diabetes in the monkey. In: 20º International Congress On Primates; 1969; New York. Proceeding New York: Kanger; 1969. v.3.

Ginsberg SP. Corneal problems in systemic disease. In: Tasman W, Jaeger EA, editors. Duane´s clinical ophthalmology [Monograph on CD-ROM] Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998.

Grey RH, Malcolm N, O´Reilly D, Morris A. Ophthalmic survey of a diabetic clinic. I: Ocular findings. Br J Ophthalmol, 1986;70:797-803.

Harkness JE, Wagner JE. Biologia e clínica de coelhos e roedores. São Paulo: Roca; 1993.

Harris M I, Hadden WC, Knowler WC, Bennett PH. Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance and plasma glucose levels in U.S. population aged 20-74 year. Diabetes 1987;36:523-34.

Heath H. Experimentally induced retinopathies in relation to the problem of diabetes. Br Med Bull 1970;26:151-5.

Herse PR. Corneal Hydration control in normal and alloxan-induced diabetic rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci 1990;31:2205-13.

Herse P, Adams L. Effect of hyperglycemia duration on rabbit corneal thickness and endothelial ATPase activity. Acta Ophthalmol Scand 1995;73;158-61.

Hidayat AA, Fine BS. Diabetic choroidopathy: lighy and electron microscopic observations of seven cases. Ophthalmology 1985; 92:512-22.

Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE. The cornea. In: Histology of the human eye: an atlas and teatbook. Philadelphia: W. B. Saunders; 1971. 55-109.

Ishida N, Rao GN, Del Gerro M, Aquarella JV, Corneal nerve alterations in diabetes mellitus. Arch Ophthalmol 1984;102:1380-4.

Johnson DH, Bourne WM, Campbell RJ. The ultrastructure of Descemet´s membrane. I. Changes with age in normal cornea. Arch Ophthalmol 1982;100:1942-7.

Jorge EC. Retinopatia diabética: estudo ultraestrutural e morfométrico do epitélio pigmentar de ratos normais e aloxânicos [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 1996.

Junqueira LC, Carneiro J. Bases macromoleculares da constituição celular. In: Biologia celular e molecular. 6ª ed**.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p.39-62.

Kaji Y, Usui T, Oshika T, Matsubara M, Yamashita H, Araie, M, et al. Advanced Glycation end products in diabetic corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41:362-8.

Keoleian GM, Pach JM, Hodge DO, Trocme SD, Boume WM. Structural and functional studies of the corneal endothelium in diabetes mellitus. Am J Ophthalmol 1992;113:64-70.

Kincaid MC. Pathology of diabetes mellitus. In: Tasman W, Jaeger EA, editors. Duane`s foundations of clinical ophthalmology [monograph on CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998.

Kinoshita JH Some aspects of the carbohydrate metabolism of the cornea. Invest Ophthalmol 1962;1:178.

Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy XIV. Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy Arch Ophthalmol 1994;112:1217-28.

Klyce SD, Beurman RW. Structure and function of the cornea. In: Kaufman HE Barron BA, McDonald MB, Watman SR, editors. The Cornea. New York: Churchill Livingstone; 1988. p.4.

Kohner EM, Barry PJ. Pevention of blindness in diabetic retinopathy. Diabetologia 1984;26:173-9.

Kurpakus MA, Jones JC A novel hemidesmosomal plaque component tissue distribution and incorporation into assembling hemidesmosomes in an in vitro model. Exp Cell Res 1991;194:139-46.

Larsson LI, Bourne WM, Pach JM, Brubaker RF. Structure and function of the corneal endothelium in diabetes mellitus type I and type II. Arch Ophthalmol 1996;114:9-14.

Lee S, Christakos S, Small MB. Apoptosis and signal transduction: Clues tu a molecular mechanism. Curr Opin Cell Biol 1993;5:286-91.

Macedo AR, Skivolocki WP, Thompson KR, Morphometric electron – microscopy study of the whole pancreas transplantion on alloxan diabetic neuropathy. Sur Forum 1981;32: 379-80.

Macedo CS, Greenleaf GE, Syers HJ, Effect of whole pancreas transplantation on long-stablished kidney lesions in diabetes. Surg Forum 1985;36:346-8.

Macedo CS, Mercadante MCS, Macedo AR. Controle do diabetes por meio do transplante de ilhotas de Langerhans, preparadas sem o emprego da digestão enzimática: estudo experimental no rato. Ver Hosp Clin Fac Med São Paulo 1986;41:55-60.

Macedo CS, Riyuzo MK, Mercadante MCS. Nefropatia diabética em ratos: estudo comparativo entre a diabetes induzida pela aloxana e pela estreptozotocina. In: 41st Jornada Brasileira de Nefrologia Pediátrica; 1987; Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Pediatria; 1987. p.59.

Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 years: the Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Diabetes Care 1992;15:1509-16.

Marshall GE, Konstas AG, Lee WR. Immunogold fine structural localization of extracellular matrix compounds in aged human cornea. II. Collagen types V and VI. Grafes Arch Clin Exp Ophthalmol 1991; 229:164-71.

Matsuda M. Ohguro N, Ishimoto I, Fukuda M., Relationship of corneal endothelial morphology to diabetic retinopathy, duration of diabetes and glycemic control. Jpn J Ophthalmol 1990;34:53-6.

Maurice Dm: The permeability to sodium ions of the living rabbit´s cornea. J Physiol. 1951;112:367-91.

Maurice Dm. The location of the fluid pump in the cornea. J Physiol 1972;221:43-54.

Maurice Dm. The córnea and sclera. In: Davson H, editor. The Eye. 3rd ed. New York: Academic Press; 1984. p.75-85.

McNamara NA, Brand RJ, Polse KA, Bourne WM. Corneal function during normal and high serum glucose levels in diabetes. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998;39:3-17

McPhee TJ, Bourne WM, Brubaker RF. Location of the stress-bearing layers of the cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 1985;26:869-72.

Mikelberg FS, Drance SM. Glaucomatous visual field defects. In: Ritch R, Shields MB, Krupin T. The glaucomas. 2 ed. St. Louis: Mosby; 1996. p.523-37.

Montgomery DC. Design and analysis of experiments. 3 ed. New York: John Wiley; 1991. 649p.

Mordes JP, Rossini AA. Animal models of diabetes. Am J Med 1981;70:353-60.

Mordes JP, Rossini AA. Animal models of diabetes mellitus. In: Marble A, Krall LP, Bradley RF, Christlieb AR, Soeldner JS, editors. Joslin`s diabetes mellitus. Philadelphia: Lea & Febiger; 1985. p.110-37.

Morone G, Tazzi A, Carella G, Ghisolfi A, Colombo R. Angiomorphologie du corps ciliaire dans la maladie diabetique. J Fr Ophtalmol 1985;8:555-8.

Nakayasu K, Tanaka M, Konomi H, Hayashi T. Distribution of types I, II, II, IV, and V collagen in normal and keratoconus corneas. Ophthalmic Res 1986;18:1-10.

Nelson LB, Martyn LJ. Metabolic diseases affecting the eye. In: Taman W, Jaeger EA, Duane's of clinical ophthalmology. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998.

Norman RA, Streiner DL, Biostatistics: the bare essentials. Saint Louis: Mosky; 1994.

Ohguro N, Matsuda M, Ohashi Y, Fukuda M. Topical aldose redutase inhibitor for correcting corneal endothelial changes in diabetic. Br J Ophthalmol 1995;79:1074 -7.

Olefsky J. Diabete melito. In: Wyngaarden JB, Smith LH Jr. Cecil tratado de medicina interna. 18 ed. Rio de Janeiro: Guanabara 1990. p.1198-216.

Orloff MJ, Lee S, Charters AC 3rd, Grambort DE, Storck LG, Knox D. Long term studies of pancreas transplantation in experimental diabetes mellitus. Ann Surg 1975;182:198-206.

Pinto FT. Alterações morfológicas nos vasos da íris de ratos normais e diabéticos aloxânicos [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2002.

Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37-917). Cancer Chemother Rep 1963;29:91-8.

Rehany U, Ishii Y, Lahav M, Rumelt S. Collagen pleomorphism in Descemet´s membrane of streptozotocin-induced diabetic rats. Cornea 2000;19:390-2.

Robison WG Jr, McCaleb ML, Feld LG, Michaelis OE 4, Laver N, Mercandetti Robinson WG Jr. Degenerated intramural pericytes (“ghost cells”) in the retinal capillaries of diabetic rats. Curr Exe Res 1991;10:339-50.

Rodrigues AC. Coroidopatia diabética: estudo ultraestrutural da coróide de ratos normais e diabéticos aloxânicos. [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2000.

Rosenberg ME, Tervo TMT, Immonen IJ, Muller LJ, Gronhagen-Riska C, Vesaluoma MH. Corneal struture and sensitivity in type 1 diabetes mellitus. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41:2915-21.

Roszkowska AM, Tringali CG, Colosi P, Squeri CA, Ferreri G. Corneal endotheliun evaluation in type I and type II diabetes mellitus Ophthalmologica 1999;213:258-61.

Rozsa AJ, Beuerman RW. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. Pain 1982;14:105-20.

Saini JS, Mittal S. In vivo assessment of corneal endothelial function in diabetes mellitus. Arch Ophthalmol 1996;114:649-53.

Saracco J B, Gastaud P, Ridings B, Uband CA. Diabetic choroidopathy (author`s transl). J Fr Ophtalmol 1982;5:231-6.

Sassani JW, Yanoff M, Fine BS. Uvea. In: Tasman W, Jaeger EA. Duane's of clinical ophthalmology [monograph on CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998.

Saudek CD. Diabetes mellitus. In: Harvey AM, Johns RJ, McCkusik VA, Owens AH JR, Ross RS. The principles and pratice of medicine. 22 ed. Norwalk: Appleton & Lange; 1988. p.956-68.

Schellini SA, Retinopatia diabética experimental: estudo estrutural, ultraestrutural e morfométrico da retina de ratos normais, diabéticos e diabéticos tratados [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 1992.

Schultz RO, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF, Schultz KJ. Corneal endothelial changes in type I and type II diabetes mellitus. Am J Ophthalmol 1984;98:401-10.

Sherwin RS. Diabetes mellitus. In: Goldman L, Bennett JC. Cecil textbook of medicine. 21 ed. Philadelphia: Saunders; 2000. p.1263-85.

Shields MB. Glaucoma primário de ângulo aberto. In: Glaucoma. 2a. ed. São Paulo: Panamerica; 1989. p.153-75.

Spadella CT. Avaliação funcional do transplante pancreatoduodenal no rato diabético [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 1989.

Spirandelli PE, Schellini AS, Gregório E, Padovani CR. Ultrastructural and morphometric alterations in íris nerves of diabetic rats [abstract]. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999;40:S446.

Tilton RG, LaRose LS, Kilo C, Williamson JR. Absence of degenerative changes in retinal and uveal capillary pericytes in diabetic rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 1986;27:716-21.

Ueda T, Lee S, Sotrck G. Metabolic effect of alloxan diabetic rats before and after pancreas transplantation. Proc Anat Microsurg Soc 1979;3:423-4.

Ziadi M, Moiroux P, DÀthis P, Brun JM, Creuzot-Garcher C. Assessment og induced corneal hypoxia in diabetic patients. Cornea 2002;21:453-7.

Yanoff M, Fine BS. Diabetes mellitus. In: Patologia ocular: atlas colorido. São Paulo: Santos; 1991. p.187-95.

Yee RW, Matsuda M, Kern TS, Engerman RL, Edelhauses HF. Corneal endothelial changes in diabetic dogs. Curr Eye Res 1985; 4:759-66.

Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. N Engl J Med 1979;300:1173-9.

Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium: normal and pathological structure and function. Ophthalmology 1982; 89:531-90.

Weston BC, Bourne WM, Polse KA, Hodge DO. Corneal hydration control in diabetes mellitus. Invest Ophthalmol Vis Sci 1995;36:586-95.

Wilson PW, Anderson KM, Kannel WB. Epidemiology of diabetes mellitus in the elderly: the Framingham Study. Am J Med 1986;80 suppl 5A:3-9.

ABSTRACT

ABSTRACT

The objective of study was to make na assessment of experimental diabetes influence on of rats corneal endothelium ultra-structure. The study was prospective, using 20 Wistar 3-month-old rats, divided (by draw) into groups: control group (GC), with 10 rats, and diabetic group (GD), with 10 rats. The diabetes induction was made by means of intravenous injection of Aloxan 42 mg/Kg weigth. After the diabetes induction (M1), the animals had been observed for 15 days, and then, 1 month after M1 (M2) and 12 months after M1 (M3) to confirm the diagnosis of severe diabetes.

At experimental moments M2 and M3, the animals eyes enucleation and preparation were carried out for assessment trough transmission eletronic microscopy.

GD animals had shown significant reduction of weigth, increasing of hydric and nourishing injection and increasing of diuresis in relation to GC rats.

In the morphological assessment, dense bodies and Myelin figures were observed in M3 GC animals. GC rats had presented the same alterations found in GC animals in M3, in major intensity, beyond mitochondrias rather modified in their form and size, cytoplasm rarefaction, vesicles increasing and nuclear alterations. It is concluded that experimental diabets causes ultra-structural of rats corneal endothelium.

Apêndice

Apêndice

Apresentação das medidas efetuadas, segundo o grupo experimental (controle / diabético) e momento de sacrifício (M2: 45 dias após o início do experimento / M3: 380 dias após o início do experimento).

Grupo Experimental	Momento Do Sacrifício	Peso Corporal	Diurese	Ingestão Hídrica	Glicemia	Glicose Urinária
Controle	M2	360	9	43	115	6
Controle	M2	320	17	55	106	8
Controle	M2	350	12	48	97	4
Controle	M2	370	16	50	102	8
Controle	M2	355	11	45	92	9
Controle	M3	380	16	55	138	12
Controle	M3	345	5	16	97	21
Controle	M3	405	11	40	90	30
Controle	M3	470	20	60	128	15
Controle	M3	480	16	55	140	19
Diabético	M2	270	63	118	323	5.282
Diabético	M2	255	48	98	474	4.473
Diabético	M2	225	121	134	529	5.212
Diabético	M2	275	77	112	385	4.727
Diabético	M2	205	132	170	574	6.751
Diabético	M3	280	90	136	672	4.999
Diabético	M3	295	115	130	512	4.484
Diabético	M3	335	63	138	324	3.852
Diabético	M3	260	96	168	482	4.282
Diabético	M3	250	30	142	460	4.602