

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

---

**ALTERAÇÕES HISTOQUÍMICAS E ULTRAESTRUTURAIS DO**  
**FÍGADO E INTESTINO GROSSO DE RATOS DIABÉTICOS TIPO I E**  
**OS EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO.**

**RAFAEL NEODINI REMEDIO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro  
2010

RAFAEL NEODINI REMEDIO

ALTERAÇÕES HISTOQUÍMICAS E ULTRAESTRUTURAIS DO FÍGADO E INTESTINO GROSSO DE RATOS DIABÉTICOS TIPO I E OS EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**Orientador:** Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano

**Co-orientador:** Prof. Dr. Ricardo José Gomes

Rio Claro  
2010

Dedico este trabalho aos meus pais, avós e irmãos,  
à minha namorada, e a todos que o tornaram possível.

“Escolhe um trabalho de que gostes, e não  
terás que trabalhar um dia na tua vida.”

Confúcio

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus, por tudo que tem me proporcionado. Agradeço também a meus pais, Paulo e Rosângela, meus avós, Waldir e Maria Cândida, meus irmãos, Leandro e Vitor, e minha namorada Júlia, e a todos os meus familiares, pela força e pelo apoio incondicional.

Agradeço a meus grandes amigos, Alexandre, Henrique, Rodrigo, Bruno, Débora, Beatriz e Laura, pelos momentos de reflexão e também de descontração.

Não poderia deixar de agradecer a meu orientador Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano, pela convivência e pelo grande auxílio no desenvolvimento deste estudo. Agradeço a meu co-orientador, o Prof. Dr. Ricardo José Gomes pela grande ajuda prestada a este trabalho. Agradeço também a todos que de alguma forma colaboraram com este trabalho: Profa. Dra. Eliete Luciano, José Alexandre Curiacos; China e Beto, técnicos do Laboratório de Biodinâmica; Antônio e Mônica, técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica; Gérson, técnico do Laboratório de Histologia; Fernando José Zara e Dimitrius Pitol; e a todas as pessoas cujos nomes não foram mencionados, mas que se considerem no direito de estarem aqui.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro dado a este trabalho.

## RESUMO

O diabetes mellitus resulta de uma complexa interação entre vários graus de susceptibilidade genética e fatores ambientais. Sua principal característica é a secreção deficiente de insulina (hipoinsulinemia), ou ainda a baixa sensibilidade dos tecidos periféricos a este hormônio, fatos que resultam em uma elevação característica nos níveis de glicose no sangue (hiperglicemia). O diabetes tipo I caracteriza-se pela hipoinsulinemia, sendo acompanhado por alterações metabólicas e bioquímicas, além de prejuízos morfológicos em diversos tecidos, como o fígado e o intestino grosso. A prática regular de exercícios é reconhecida como um fator preventivo muito importante para os casos de diabetes, aumentando a sensibilidade e resposta à insulina e diminuindo sua necessidade em indivíduos diabéticos. A fim de analisar estas alterações, ratos Wistar foram distribuídos em quatro grupos: controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT). O diabetes foi induzido por aloxana monoidratada Sigma. Amostras de fígado e intestino grosso foram coletadas para a realização de técnicas histoquímicas e ultraestruturais. Desta forma, este estudo teve como objetivo principal investigar os prejuízos provenientes do desenvolvimento do diabetes nos tecidos analisados e, a partir desta análise, avaliar os efeitos do treinamento físico na amenização ou prevenção destas alterações. Resultados histoquímicos bastante expressivos foram encontrados no fígado, principalmente em relação ao acúmulo de glicogênio e de fibras colágenas perisinusoidais nas células hepáticas que, após a realização de treinamento físico moderado, atingiram níveis mais próximos dos considerados normais. Os resultados ultraestruturais demonstraram grandes alterações na presença de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso no citosol dos hepatócitos de ratos diabéticos. Leve recuperação foi observada em virtude da prática de exercícios. O intestino grosso, por sua vez, apresentou modificações histoquímicas significativas na quantidade de mucinas secretadas, além de alterações no teor de colágeno na submucosa, amenizadas pela prática de um protocolo de treinamento físico. Ultraestruturalmente, algumas mudanças foram detectadas, especialmente em relação às

interdigitações das células absortivas e quantidade de unidades do complexo de Golgi nas células caliciformes, condições recuperadas pela prática de exercícios periódicos. Desta forma, de acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a prática periódica de exercícios físicos pode ser considerada como um fator de grande auxílio no tratamento de pacientes diabéticos tipo I, com importantes benefícios morfológicos no fígado e no intestino grosso.

**Palavras-chave:** Diabetes. Exercício. Histoquímica. Ultraestrutura. Intestino grosso. Fígado.

## **ABSTRACT**

Diabetes mellitus results from a complex interaction between various degrees of genetic susceptibility and environmental factors. Its main feature is a deficient insulin secretion (hypoinsulinemia), or the low sensitivity of peripheral tissues to this hormone, facts that result in a characteristic elevation of blood glucose levels (hyperglycaemia). Type I diabetes is characterized by hypoinsulinemia, and is followed by metabolic and biochemical alterations, besides morphological impairment in various tissues, such as liver and large intestine. Regular exercise is recognized as an important preventative factor in cases of diabetes, increasing sensitivity and response to insulin and decreasing its necessity in diabetic individuals. In order to analyze these changes, Wistar rats were divided into four groups: Sedentary Controls (SC), Trained Controls (TC), Sedentary Diabetics (SD) and Trained Diabetics (TD). Diabetes was induced by monohydrate alloxan Sigma. Liver and large intestine samples were collected for carrying out histochemical and ultrastructural techniques. Thus, this study aimed to investigate the damage proceeding from the development of diabetes in the analyzed tissues and evaluate, from this analysis, the effects of physical training in alleviating or preventing these changes. Very promising histochemical results were found in the liver, especially related to the accumulation of glycogen and perisinusoidal collagen fibers in liver cells that, after performing moderate physical training, reached levels near those considered normal. Ultrastructural results showed important variations in the presence of mitochondria and rough endoplasmic reticulum in the cytosol of diabetic rats' hepatocytes. Slight recovery was observed as result of exercise. Large intestine, in turn, presented significant histochemical changes in the amount of mucin secreted, besides alterations in collagen content in the submucosa, mitigated by the practice of a physical training protocol. Ultrastructurally, some changes were detected, especially related to absorptive cells' interdigitations and goblet cells' units of Golgi apparatus, conditions recovered by practicing periodic exercises. Therefore, according to the results, we conclude that the practice of regular physical exercises can be considered a factor that provides great



help in treating type I diabetic patients, with important morphological benefits in the liver and large intestine.

**Keywords:** Diabetes. Exercise. Histochemistry. Ultrastructure. Large intestine. Liver.

## SUMÁRIO

	Página
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	14
<b>METODOLOGIA GERAL</b> .....	15
<b>CAPÍTULO I – Análise histoquímica e ultraestrutural do fígado de ratos diabéticos tipo I e os efeitos do exercício físico.</b> ....	18
1.1.    Resumo .....	19
1.2.    Introdução .....	20
1.3.    Objetivos .....	22
1.4.    Materiais e métodos .....	23
1.4.1.    Histologia/histoquímica .....	23
1.4.2.    Ultraestrutura .....	24
1.4.3.    Análise dos resultados histoquímicos e ultraestruturais .....	26
1.4.4.    Análises bioquímicas e medidas de peso .....	26
1.4.5.    Comitê de ética em pesquisa .....	27
1.5.    Resultados .....	28
1.5.1.    Histologia/histoquímica .....	28
1.5.2.    Ultraestrutura .....	30
1.5.3.    Análises bioquímicas e medidas de peso .....	31
1.5.4.    Tabelas, gráficos e figuras .....	33
1.6.    Discussão .....	49
1.7.    Conclusão .....	59
1.8.    Bibliografia .....	60
<b>CAPÍTULO II – Análise histoquímica e ultraestrutural do intestino grosso de ratos diabéticos tipo I e os efeitos do exercício físico.</b> .....	65
2.1.    Resumo .....	66
2.2.    Introdução .....	67
2.3.    Objetivos .....	69
2.4.    Materiais e métodos .....	70
2.4.1.    Histologia/histoquímica .....	70
2.4.2.    Ultraestrutura .....	71
2.4.3.    Análise dos resultados histoquímicos e ultraestruturais .....	72
2.4.4.    Comitê de ética em pesquisa .....	73
2.5.    Resultados .....	74
2.5.1.    Histologia/histoquímica .....	74
2.5.2.    Ultraestrutura .....	76
2.5.3.    Tabela e figuras .....	78
2.6.    Discussão .....	97
2.7.    Conclusão .....	104
2.8.    Bibliografia .....	105
<b>ANEXO I – Peso corporal</b> .....	109
<b>ANEXO II – Glicemia</b> .....	112
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	115
<b>BIBLIOGRAFIA GERAL</b> .....	116

## INTRODUÇÃO GERAL

O diabetes mellitus é um problema de saúde pública mundial, e está alcançando proporções epidêmicas em países desenvolvidos (LERCO et al, 2003; WEI et al, 2003). Caracteriza-se por uma desordem metabólica que ocorre em decorrência da deficiência absoluta ou relativa de insulina, ou ainda da baixa sensibilidade dos tecidos periféricos a este hormônio, fatos que resultam em uma elevação característica nos níveis de glicose no sangue, a hiperglicemia. Estima-se que existam mais de 150 milhões de pessoas com diabetes no mundo, sendo que projeções da OMS para 2025 sugerem que esse número possa chegar a 300 milhões (LERCO et al, 2003).

De todos os casos de diabetes, apenas 5-10% correspondem ao diabetes mellitus do tipo I (DANEMAN, 2006; DE ANGELIS et al, 2006), caracterizado por um quadro de hipoinsulinemia, ou seja, deficiência parcial ou absoluta em insulina, gerada pela destruição das células beta-pancreáticas, sendo esta ocorrência, na grande maioria dos casos, fruto de processos auto-imunes desencadeados após uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais. O diabetes do tipo I pode ser encontrado em pessoas de qualquer faixa etária; entretanto, é geralmente diagnosticado antes dos 20 anos de idade (DE ANGELIS et al, 2006). Além disso, é acompanhado por alterações metabólicas e bioquímicas, além de prejuízos morfológicos em diversos tecidos. Sua incidência é variável, e continua a crescer pelo mundo, tendo sérias implicações a curto e longo prazos (DANEMAN, 2006). O diabetes ainda é, hoje, uma das principais causas de incapacitação física para o trabalho, tornando o seu portador propenso à cegueira, nefropatia, amputação de membros e doenças cardiovasculares (LERCO et al, 2003). Suas complicações consistem em doenças micro e macrovasculares, que contabilizam para a maioria da morbidade e mortalidade associadas ao diabetes (DANEMAN, 2006). Os indivíduos diabéticos também podem desenvolver poliúria, polidipsia, polifagia, glicosúria, infecções cutâneas e genitais, alterações visuais, além de distúrbios renais, neurológicos e cardiovasculares (BROTMAN; GIROD, 2002).

Drogas específicas, tais como a aloxana (ALX) e a estreptozotocina (STZ), podem induzir o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo I a partir da destruição seletiva das células beta-pancreáticas das Ilhotas de Langerhans, gerando um quadro de hipoinsulinemia permanente (LERCO et al, 2003; WEI et al, 2003; LENZEN, 2008). Estas drogas são os químicos diabetogênicos mais notáveis na pesquisa em diabetes. Ambos são análogos citotóxicos da glicose. Embora sua citotoxicidade seja alcançada através de caminhos diferentes, seus mecanismos de ação seletiva nas células beta são idênticos (LENZEN, 2008). A hipoinsulinemia leva ao desenvolvimento da hiperglicemia, e estes aumentos nos níveis de glicose sanguínea são responsáveis por inúmeras alterações na quantidade de glicogênio e fibras de colágeno do fígado (VALLANCE-OWEN, 1952; EVANS, LITTLER, PEMBERTON, 1955; MUNNS et al, 2000; ARKKILA et al, 2001; MARTOCCHIA et al, 2008; LEME et al, 2009), e na taxa de secreção e teor de colágeno da submucosa do intestino grosso (BERNUAU et al, 1985; KANDEMIR et al, 1995; UNAL et al, 2008) de indivíduos diabéticos tipo I.

Conforme as taxas de incidência de casos de diabetes mellitus continuam a crescer, a prática de exercícios físicos continua sendo uma forma fundamental de terapia. O exercício influencia muitos aspectos do diabetes, incluindo concentrações de glicose sanguínea, ação da insulina e fatores de risco cardiovascular (CHIPKIN; KLUGH; CHASAN-TABER, 2001). Durante os últimos 50 anos, muitos estudos têm sublinhado a função central do exercício físico no tratamento de pacientes diabéticos tipo I e II. Os numerosos benefícios descritos em indivíduos normais que praticam exercício regular também foram demonstrados em pacientes com diabetes, que obtiveram significativas vantagens físicas e psicológicas no cuidado da doença (CHIPKIN, KLUGH, CHASAN-TABER, 2001; GIANNINI et al, 2007).

A prática regular de exercícios físicos é considerada como sendo um fator importante de controle do diabetes, já que induz adaptações metabólicas relevantes, como, por exemplo, o aumento na utilização do glicogênio muscular durante o exercício físico, aumento do tamanho e do número das mitocôndrias musculares, bem como o aumento da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina (KRAUS et al, 2002; LUCIANO et al, 2002; DE ANGELIS et al, 2006). O treinamento físico modula a homeostase da glicose em diabéticos e previne alguns danos, aumentando a sensibilidade e resposta à insulina. Muitos dos efeitos benéficos do exercício resultam de interações entre hormônios específicos e fatores de crescimento, como o IGF-I (LEME et al, 2009). Além disso, eleva a captação periférica de glicose por meio da translocação dos transportadores de glicose (GLUT4) do músculo esquelético estriado (GOODYEAR, HIRSHMAN, HORTON, 1991; HARDIN et al, 1995). Os efeitos na

utilização de substratos e na sensibilidade à insulina tornam potencialmente menores os níveis de lipídios e glicose no sangue (WALLBERG-HENRIKSSON, RINCON, ZIERATH, 1998; CHIPKIN, KLUGH, CHASAN-TABER, 2001). O treinamento físico também aumenta a captação periférica de aminoácidos, além de ajudar a preservar os estoques musculares de glicogênio e reduzir o catabolismo protéico que ocorre em indivíduos diabéticos tipo I (LUCIANO, MELLO, 1998; NIELSEN et al, 2001).

Um grande número de estudos mostrou que a prática habitual de exercícios físicos reduz o risco de doenças cardíacas, derrame cerebral, mortalidade e câncer de cólon. Ela afeta o metabolismo da glicose e outros substratos intermediários em indivíduos normais e com diabetes mellitus, tendo importantes efeitos na demanda de insulina e evitando hipo ou hiperglicemia severa (DE FEO et al, 2006)

Insulinoterapia, exercícios físicos regulares e planejamento alimentar, em conjunto, consistem na abordagem mais completa no tratamento de portadores de diabetes mellitus tipo I. Este tratamento tem como objetivo aproximar as condições metabólicas do indivíduo diabético tipo I de um estado fisiológico normal, conseqüentemente prevenindo ou retardando as complicações crônicas do diabetes (DE ANGELIS et al, 2006).

O exercício físico moderado reduz a necessidade de insulina em indivíduos normais e diabéticos e a combinação entre uma dieta pobre em gorduras e exercícios físicos regulares podem reduzir ainda mais a necessidade de insulina (STEPPEL; HORTON, 2003).

## **OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral deste trabalho foi analisar, por meio da utilização de técnicas histoquímicas e ultraestruturais, os prejuízos morfológicos resultantes do desenvolvimento do diabetes mellitus tipo I no fígado e no intestino grosso e, a partir deste estudo, avaliar os efeitos do treinamento físico moderado na atenuação ou prevenção destas alterações.

## METODOLOGIA GERAL

Foram utilizados 32 ratos machos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com aproximadamente 70 dias de idade no início do experimento, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, e mantidos no Biotério do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Rio Claro. Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, medindo 37 x 31 x 16 centímetros, e mantidos à temperatura ambiente de 25° C, com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, alimentados com ração balanceada padrão Purina e água *ad libitum*.

### Indução do diabetes e delineamento experimental

Para indução do diabetes experimental, 16 ratos foram separados para serem utilizados como indivíduos controle, e os restantes foram anestesiados moderadamente com éter etílico. Em seguida, receberam Aloxana monoidratada Sigma (35 mg/kg de peso corporal), dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5, injetada na veia peniana. Após este procedimento, os ratos foram recolocados nas gaiolas, recebendo no primeiro dia pós-aloxana, uma solução de água e glicose (15%), além de ração (LUCIANO; LIMA, 1997). Cinco dias após a administração da droga, foi realizado um teste de glicemia para comprovação do estado diabético dos animais, sendo considerados diabéticos apenas aqueles ratos que apresentaram glicemia igual ou superior a 200 mg por 100 mL de sangue.

Os ratos diabéticos, juntamente com os animais não induzidos (sadios), foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

- **Controle Sedentário (CS)** - ratos sadios que não realizaram exercícios físicos (n=8);
- **Controle Treinado (CT)** - ratos sadios que realizaram um protocolo de exercícios físicos (n=8);

- **Diabético Sedentário (DS)** - ratos diabéticos aloxânicos que não realizaram exercícios físicos (n=8);
- **Diabético Treinado (DT)** - ratos diabéticos aloxânicos que realizaram o mesmo protocolo de exercícios físicos do grupo (CT) (n=8);

#### Protocolo de treinamento e sacrifício

Todos os ratos foram submetidos a testes de esforço para a identificação da Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL). A MFEL equivale à mais alta concentração de lactato sanguíneo na qual sua entrada na circulação é compensada pela remoção durante exercícios com cargas constantes, evitando efeitos como o desgaste físico, exaustão e câibras. Os animais foram submetidos a vários testes de natação suportando sobrecargas constantes e crescentes em relação ao peso corporal, até que não fosse mais possível estabilização das concentrações de lactato sanguíneo durante a sessão de exercício. Cada teste consistiu de 30 minutos de natação contínua suportando uma carga, com coleta de sangue, por meio de cortes na extremidade da cauda a cada 5 minutos para a determinação das concentrações de lactato. Houve um intervalo de 48 horas entre os testes. O critério de estabilização a ser empregado foi a diferença igual ou inferior a 1,0mM de lactato sanguíneo entre 10 e 20 minutos de exercício (GOMES et al, 2009).

Após a determinação da MFEL, os animais passaram por um período de adaptação ao meio líquido com aumento progressivo de carga atada ao tórax, com a finalidade de respeitar o princípio fisiológico da sobrecarga, posteriormente utilizada durante a execução do protocolo de treinamento.

O protocolo de exercícios consistiu de natação por 60 minutos diários, 5 dias por semana, durante 8 semanas consecutivas. Foram acopladas ao tórax dos animais cargas referentes à média dos valores obtidos através da determinação da MFEL: 5,2% do peso corporal de ratos controle, e 4,8% do peso corporal de ratos diabéticos.

Os ratos foram pesados semanalmente e as cargas utilizadas para o treinamento físico foram ajustadas de acordo com a alteração do peso de cada animal (Anexo I). As sessões de natação ocorreram em período matinal, e foram realizadas em recipiente de amianto com 100 cm de comprimento, 70 cm de largura e 60 cm de altura. Os recipientes continham água a uma profundidade de 40 cm, de tal forma que os animais não pudessem apoiar a cauda no fundo do tanque. A temperatura da água foi controlada por meio de um aquecedor elétrico, sendo mantida em  $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante a realização do protocolo.



Ao final do período experimental, os ratos de cada grupo foram mantidos em repouso por 48 horas em relação à última sessão de exercícios, sem jejum prévio. Os animais foram previamente anestesiados em câmara de CO<sub>2</sub>, e sacrificados por decapitação em guilhotina.

O sangue foi coletado 72 horas antes do sacrifício e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, e a partir do soro foi realizada a análise de glicemia: a glicose foi determinada pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase (HENRY; CANNON; WILKEMAN, 1974). Por meio da análise dos valores dos testes de glicemia dos animais, ao final do protocolo de exercícios físicos, foi calculada a glicemia média por grupo de indivíduos (Anexo II). A partir do resultado obtido, foram selecionados três animais de cada grupo como indivíduos representativos do grupo. Os ratos selecionados foram aqueles que apresentaram valores de glicemia mais próximos da média obtida para seu grupo. Estes forneceram as amostras de tecidos que foram analisadas em laboratório, através de técnicas histoquímicas e ultraestruturais.

# Capítulo I

Alterações histoquímicas e ultraestruturais do fígado de ratos diabéticos tipo I  
e os efeitos do treinamento físico.

### 1.1. RESUMO

Alterações das funções hepáticas são comuns entre pacientes diabéticos, e inúmeros sintomas no fígado já foram relatados, incluindo alterações nos estoques de glicogênio e na quantidade de fibras colágenas. A prática de exercícios físicos e seus efeitos morfológicos neste órgão, contudo, são muito pouco estudados. A fim de se analisar as alterações oriundas do desenvolvimento do diabetes tipo I, e os benefícios da prática regular de exercícios físicos, amostras do fígado foram coletadas e processadas, e em seguida analisadas por meio de técnicas histoquímicas e ultraestruturais. Na avaliação tecidual, modificações importantes foram detectadas. Foi observada redução drástica nos estoques de glicogênio hepático, recuperados em indivíduos diabéticos treinados. Além disso, foi detectado aumento no teor de fibras colágenas perisinusoidais, também recuperado em virtude do desenvolvimento do protocolo de treinamento nos ratos diabéticos. Em nível ultraestrutural, as análises citoquímicas comprovaram a perda de glicogênio, mas não indicaram mudanças nos conteúdos lipídicos do fígado. Os hepatócitos apresentaram-se com morfologia alterada, indicando tendência à diminuição na síntese protéica. O treinamento físico, por sua vez, tornou as características das células hepáticas de diabéticos mais próximas daquelas dos indivíduos controle. Desta forma, conclui-se que a prática de um protocolo regular de exercícios pode ser considerada como um fator importante no tratamento de indivíduos diabéticos, amenizando ou mesmo prevenindo a ocorrência de possíveis prejuízos no tecido hepático.

## 1.2. INTRODUÇÃO

O fígado é a maior massa de tecido glandular do organismo e o maior órgão interno, responsável principalmente pela produção e secreção de muitas proteínas plasmáticas circulantes, além de manter o nível sanguíneo de glicose, regular os níveis de lipoproteínas circulantes, e degradar ou conjugar inúmeras substâncias tóxicas e medicamentos (ROSS, PAWLINA, 2008; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008).

É também um dos primeiros componentes do sistema de processamento de carboidratos nos seres humanos, e sua performance metabólica neste processo é regulada pela atividade secretória das células beta-pancreáticas (AOKI et al, 1983). Por este motivo, desorganizações das funções hepáticas são comuns em pacientes com diabetes mellitus. Acredita-se, também, que exista uma fraca associação entre o diabetes tipo I e as doenças auto-imunes do fígado (JAMIESON, 2003).

Muitos estudos já mostraram a associação entre complicações específicas do diabetes e distúrbios em vários tecidos, tais como nefropatia e doenças cardiovasculares, mas apenas dados limitados estão disponíveis a respeito da possibilidade de associação entre complicações do diabetes e funções hepáticas (ARKKILA et al, 2001). A comparação de áreas periportais e centrolobulares dos lóbulos hepáticos permitiu a observação de diferenças nas quantidades de glicogênio, gordura, colágeno e das características das células mesenquimais (BALÁZS; HALMOS, 1985).

Os estoques de glicogênio hepático podem se apresentar em quantidades variáveis em indivíduos diabéticos (CLORE et al, 1992). Não estão determinados, contudo, se os aspectos do metabolismo alterado do glicogênio hepático refletem mudanças inerentes ao órgão, ou apenas mudanças nos constituintes circulantes no sangue, que podem controlar o metabolismo hepático. Também não há certeza se as mudanças no metabolismo do glicogênio hepático resultam do declínio nas ações diretas da insulina no fígado, ou se elas se devem à capacidade alterada de estoque de glicogênio, em vez de mudanças em sua taxa de síntese (WHITTON; HEMS, 1975).

Altos níveis de glicogênio sintase foram encontrados no fígado de indivíduos diabéticos, e supõe-se que esta quantidade elevada pode ser considerada como uma tentativa para compensar os altos níveis de glicose no fígado, oriunda do sangue, e convertida, portanto, em glicogênio hepático (BAHNAK; GOLD, 1982). O influxo de glicose nas células via difusão passiva independente de insulina seria responsável pela patogênese da glicogenose hepática em pacientes diabéticos sem controle metabólico (CHATILA, WEST, 1996; ABACI et al, 2008). Em ratos diabéticos privados de alimentação, contudo, forte prejuízo na síntese de glicogênio hepático foi observado (WHITTON; HEMS, 1975). O empobrecimento do fígado em relação ao glicogênio, observado também em indivíduos diabéticos não privados de alimentação, seria a causa mais importante da cetose diabética e posterior acidose (VALLANCE-OWEN, 1952).

O diabetes se encontra intimamente associado a um aumento significativo nos níveis de cadeias ramificadas de aminoácidos no plasma e fígado de ratos e humanos, que é resultado não apenas do elevado catabolismo protéico no diabetes inicial, mas também da hiperfagia e elevada absorção intestinal de aminoácidos conforme a doença progride (BAHNAK; GOLD, 1982). No entanto, as taxas de degradação protéica em animais diabéticos induzidos por drogas, como a estreptozotocina e aloxana, parecem ser dependentes de inúmeros fatores, incluindo a droga usada, a duração do estado diabético e as espécies examinadas (LENK et al, 1992).

A prática periódica de um protocolo de treinamento físico vem sendo considerada como fator de grande auxílio no tratamento do diabetes nos últimos anos (GIANNINI et al, 2007). De acordo com alguns trabalhos, a prática de exercícios físicos recupera os estoques de glicogênio hepático em ratos diabéticos, além de reduzir a quantidade de glicose no sangue, melhorando suas condições metabólicas e reduzindo os efeitos deletérios da hiperglicemia no organismo (BLAWACKA, KARÓN, ROTH, 1978; GOBATTO, 1993; LEME et al, 2007).

### **1.3. OBJETIVOS**

O objetivo geral deste trabalho foi analisar, por meio da utilização de técnicas histoquímicas e ultraestruturais, os prejuízos morfológicos resultantes do desenvolvimento do diabetes mellitus tipo I no fígado e, a partir deste estudo, avaliar os efeitos do treinamento físico moderado na atenuação ou mesmo na recuperação ou prevenção destas alterações.

## 1.4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.4.1 HISTOLOGIA/HISTOQUÍMICA

Amostras do fígado foram coletadas, sempre no mesmo lóbulo hepático, e fixadas em Bouin, de forma que se obteve uma porção representativa do órgão de cada rato.

Os tecidos foram incluídos em historesina Leica e cortados em Micrótomo Leica RM2145 na espessura de 6 micrômetros. Os cortes foram, então, submetidos às seguintes técnicas histoquímicas:

- Hematoxilina-Eosina (H-E) - rotina.

Os cortes foram hidratados, corados com Hematoxilina por 10 minutos, e reagiram com água por 4 minutos. Posteriormente, foram lavados e corados com Eosina, por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados e montados em bálsamo do Canadá sintético (adaptado de JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S., 1983).

- Xilidine-Ponceau - proteínas coradas em laranja.

Os cortes foram corados em Xilidine-Ponceau por 30 minutos, sendo em seguida tamponados em Acetato de Sódio (pH=2,5) a 3,5% por um minuto. Logo depois, foram lavados em água destilada e montados em bálsamo do Canadá sintético (adaptado de MELLO; VIDAL, 1980).

- Ácido Periódico de Schiff (PAS) - polissacarídeos corados em vermelho.

Os cortes reagiram por 10 minutos com solução de Ácido Periódico 0,4%. Em seguida, foram lavados em água destilada e colocados no Reativo de Schiff por 1 hora, no escuro. Posteriormente, o material foi lavado em água sulfurosa (3 minutos), água corrente (20 minutos) e montado em bálsamo do Canadá sintético (adaptado de JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S., 1983).

- PAS-Alcian Blue - polissacarídeos ácidos corados em azul.

Os cortes foram hidratados em água destilada, corados com o azul de Alcian pH 2,5 por 30 minutos, e novamente lavados em água destilada. Em seguida, reagiram com solução de Ácido Periódico 1% por 5 minutos. Após outra lavagem em água destilada, o material foi colocado no Reativo de Schiff por 30 minutos, no escuro, lavado em água sulfurosa (1 minuto), água corrente (10 minutos) e montado em bálsamo do Canadá sintético (adaptado de JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S., 1983).

- Picrosirius-Hematoxilina - fibras colágenas totais coradas em vermelho.

Os cortes foram corados na solução de Picrosirius por 60 minutos, a 60°C, lavados em água, e contra-corados com Hematoxilina por 10 minutos. Em seguida, foram lavados novamente em água, e montados com bálsamo do Canadá sintético (adaptado de JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S., 1983).

Após o tratamento do material, por meio das técnicas histoquímicas listadas, e a montagem em bálsamo do Canadá sintético, o material foi fotografado em fotomicroscópio Leica DM2000, por meio da utilização do software IM50.

#### 1.4.2. ULTRAESTRUTURA

- Rotina

As amostras de fígado foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2), durante 24 horas, em geladeira. Em seguida, foram



realizadas duas lavagens em tampão cacodilato de sódio, com duração de 15 minutos cada e, logo depois, foi realizada a pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) a 1%, durante duas horas. As amostras foram, então, novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio por duas vezes de 15 minutos. O material foi contrastado em solução de acetato de uranila a 1%, dissolvido em álcool 10%, por 4 horas, no escuro, sendo em seguida desidratado em uma série gradativa de álcoois (de 70 a 100%). Posteriormente, foi embebido em resina Epon-Araldite mais acetona, na proporção de 1:1, por 24 horas. O material foi, então, incluído em resina pura e levado à estufa por 72 horas, a 60°C, para polimerização.

Os blocos de resina foram cortados em ultra-micrótomo Porter Blum, e os cortes colocados em grades de cobre. Em seguida, foram contrastados em solução de acetato de uranila, durante 45 minutos, lavados em água e posteriormente contrastados em citrato de chumbo, por 15 minutos, sendo novamente lavados em água e solução de hidróxido de sódio 0,02M (adaptado de REYNOLDS, 1963).

O material foi analisado e fotografado ao microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100 do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Departamento de Biologia, UNESP - Rio Claro.

- Afzelius - glicogênio.

As grades contendo os cortes ultra-finos obtidos na rotina para microscopia eletrônica de transmissão, sem a contrastação com solução de acetato de uranila a 1%, foram tratadas com ácido tânico 1% em água destilada, durante 60 minutos. Posteriormente as grades foram lavadas com água destilada, contrastadas em solução de acetato de uranila 4%, em água destilada, por 60 minutos, e lavadas em água destilada (adaptado de AFZELIUS, 1992).

O material foi analisado e fotografado ao microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100 do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Departamento de Biologia, UNESP - Rio Claro.

#### 1.4.3. ANÁLISE DOS RESULTADOS HISTOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS

Os dados obtidos a partir dos testes de glicemia dos indivíduos, 72 horas antes do sacrifício, resultaram em uma média glicêmica por grupo de ratos, a fim de se determinar, para cada grupo, três indivíduos representativos, que forneceram as amostras analisadas em histologia, histoquímica e ultraestrutura.

As análises dos resultados obtidos em microscopia de luz e em microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas de modo qualitativo, a partir da observação das características de cada órgão, em comparação com os indivíduos controle, tanto sedentários quanto treinados.

Os dados histoquímicos foram listados em uma tabela, na qual consta a análise da intensidade de reação de cada técnica histoquímica com os componentes específicos de cada órgão, simbolizada por sinais de +, para cada um dos três ratos escolhidos para cada grupo.

Nos animais integrantes dos grupos de análise, diferenças individuais foram observadas, tanto em histologia/histoquímica, quanto em ultraestrutura. Desta forma, para a determinação das características que representassem o perfil do grupo, cada conjunto de três indivíduos foi analisado separadamente, comparando-se os resultados obtidos entre os respectivos animais. Em cada grupo (CS, CT, DS, DT), as diferenças individuais foram descartadas, e somente foram consideradas características representativas do perfil do grupo aquelas que foram encontradas em pelo menos dois ou mais indivíduos constituintes deste grupo. Destes indivíduos foram feitas as fotos para a análise histoquímica e ultraestrutural, e posterior confecção da tabela e listagem dos resultados.

#### 1.4.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS E MEDIDAS DE PESO

##### - Peso do fígado

O fígado de cada animal sacrificado foi retirado e a mensuração de seu peso foi efetuada. As médias  $\pm$  desvio padrão do peso para cada grupo foram listadas em tabela, e os dados analisados estatisticamente através da Análise de Variância (ANOVA) One-Way, com aplicação do teste *post-hoc* de Bonferroni (teste paramétrico), com nível de significância estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ).

#### - Proteína/DNA

Amostras do fígado foram coletadas e utilizadas para avaliação do conteúdo de proteínas totais e DNA. As proteínas totais foram obtidas pelo método proposto por Lowry et al (1951), e suas absorbâncias lidas posteriormente em espectrofotômetro. O DNA foi avaliado pelo método da difenilamina e lido, posteriormente, em espectrofotômetro (GILES; MAYERS, 1965).

As médias  $\pm$  desvio padrão das proteínas totais, DNA e relação proteína/DNA para cada grupo foram listadas em tabela, e os dados analisados estatisticamente através da Análise de Variância (ANOVA) One-Way, com aplicação do teste *post-hoc* de Bonferroni (teste paramétrico), e do Teste de Kruskal-Wallis (ANOVA on Ranks), com aplicação do teste *post-hoc* de Dunn (teste não-paramétrico), com níveis de significância estabelecidos em 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 1.4.5. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Todos os procedimentos experimentais efetuados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Uniararas, sendo conduzidos de acordo com as normas sugeridas para a experimentação animal (Processo nº633/2008).

## 1.5. RESULTADOS

### 1.5.1. HISTOLOGIA/HISTOQUÍMICA

Os resultados referentes à observação e análise das técnicas histoquímicas realizadas foram determinados qualitativamente e listados na Tabela 1.

#### - Hematoxilina-Eosina (H-E)

Esta técnica foi utilizada apenas como instrumento de análise das características gerais observadas no fígado.

Algumas diferenças, contudo, puderam ser notadas, no que se refere às características citoplasmáticas dos diferentes grupos. Os citoplasmas de indivíduos CS e CT demonstraram aspecto evidentemente granular, de forma bastante semelhante, com regiões mais basófilas, diferentemente dos indivíduos diabéticos sedentários. Nestes, o citoplasma dos hepatócitos se apresentou de forma homogênea, sem demonstrar regiões de basofilia citoplasmática. Nos diabéticos treinados, no entanto, o citoplasma com granulações já pode ser novamente percebido, embora em intensidade menor que nos indivíduos CS (Figura 3).

No que diz respeito à acidez citoplasmática, não foram observadas diferenças relevantes entre os grupos, bem como sinais de inchaço citoplasmático, vacuolização, ou outros tipos de mudanças, referentes à forma e tamanho de núcleos e das células, visíveis em nível de microscopia de luz.

#### - Xilidine-Ponceau

Por meio desta técnica, foi possível analisar os grupos com relação ao teor de proteínas no tecido, em cor laranja. Em alguns aspectos, esta técnica permitiu a observação de

características semelhantes às observadas em H-E, principalmente quanto à granulação citoplasmática, novamente visualizada.

Com relação ao teor protéico dos hepatócitos, a intensidade de coloração foi praticamente a mesma em todos os indivíduos, não havendo diferenças significativas entre os grupos analisados (Figura 4).

#### - Ácido Periódico de Schiff (PAS)

Esta técnica histoquímica permite a observação de polissacarídeos neutros no tecido, em vermelho, neste caso representados pelo glicogênio hepático. Quando comparados aos indivíduos controle treinados, os indivíduos CS apresentaram quantidade pequena de glicogênio em seu hepatócitos, visto que os indivíduos CT reagiram mais intensamente à técnica histoquímica. Os indivíduos DS, por sua vez, praticamente não reagiram à técnica, diferentemente dos DT, que apresentaram intensidade de coloração muito próxima à dos ratos CS (Figuras 5). Não foi observada glicogenação de núcleos.

#### - Ácido Periódico de Schiff-Alcian Blue (PAS-Alcian Blue)

Através da utilização desta técnica histoquímica, foi possível analisar os fígados dos diferentes grupos com relação à presença de polissacarídeos ácidos (em azul). Os indivíduos CS apresentaram reação bem menos intensa com o reagente Alcian Blue, quando comparados aos ratos CT. Os indivíduos DS, no entanto, demonstraram reação muito fraca com a técnica, visto que praticamente não apresentam carboidratos em seus hepatócitos. Os diabéticos submetidos ao treinamento físico, por sua vez, mostraram grandes semelhanças, em termos de acidez de polissacarídeos, aos indivíduos CS, porém com reação em intensidade menor (Figuras 6). Novamente, não foi possível a detecção de núcleos glicogenados.

#### - Picrosirius-Hematoxilina

Alterações relevantes puderam ser visualizadas por meio do uso desta técnica, que evidenciou diferenças no teor de fibras colágenas totais, em vermelho, ao redor dos hepatócitos, mais especificamente no espaço perisinusoidal de Disse. O que se observou, neste caso, foram regiões de espessamento de fibras de colágeno, ou seja, regiões que apresentaram característico aumento em sua espessura e quantidade de fibras. Os indivíduos

CS e CT apresentaram diferenças leves em relação ao teor de colágeno hepático. No entanto, em indivíduos DS, este espessamento se mostrou mais evidente que em indivíduos CS, em mais regiões no tecido. Em indivíduos DT, foi observada leve melhora no provável quadro fibrótico do fígado, com redução das quantidades relativas de espessamentos colagenosos (Figura 7).

### 1.5.2. ULTRAESTRUTURA

#### - Rotina

Em nível ultraestrutural, não foram observadas diferenças relevantes na forma e tamanho dos hepatócitos, bem como de seus respectivos núcleos. Estes, em todos os grupos analisados, apresentaram-se arredondados, com pouca heterocromatina e nucléolo pouco evidente.

No entanto, é notável a diferença na quantidade de mitocôndrias presentes nas células hepáticas, entre os indivíduos controle e diabéticos sedentários. Em DS, as mitocôndrias praticamente preenchem todo o citosol, diferentemente de CS, cujas células apresentaram regiões não ocupadas por mitocôndrias. O treinamento físico, por sua vez, não promoveu mudanças evidentes neste aspecto, tanto entre controles quanto entre diabéticos, que mantiveram as mesmas características celulares dos indivíduos sedentários (Figuras 8 e 9).

Foi possível observar que, em indivíduos DS, a quantidade relativa de cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER), encontrado, em geral, ao redor das mitocôndrias, é aparentemente menor do que no grupo CS. Os indivíduos DT, contudo, demonstraram alteração neste padrão de características. Neste grupo, foi observada maior semelhança ultraestrutural com os indivíduos CS, evidenciada pela maior quantidade de RER, e sugerindo amenização dos efeitos deletérios do diabetes. Em indivíduos controle, o treinamento físico pouco alterou as características celulares dos hepatócitos neste aspecto (Figuras 10 e 11).

Não foram observadas diferenças significativas na estruturação das cristas mitocondriais entre indivíduos sedentários, controle e diabéticos. O treinamento físico, contudo, pode ter proporcionado diminuição na quantidade relativa de cristas mitocondriais, tanto em CT quanto em DT. A matriz mitocondrial, por sua vez, apresentou diferenças em sua eletrondensidade, sendo muito menos eletrondensa e mais granulada nos indivíduos do grupo DT, quando comparados a todos os outros grupos. Estas diferenças se devem, possivelmente,

à sobrecarga do órgão frente à prática de exercícios físicos. Não foram observadas alterações na forma e tamanho destas organelas (Figuras 12 e 13).

Não foi possível a observação de outras organelas, apenas mitocôndrias e RER bastante evidentes.

- Afzelius (glicogênio)

Entre os grupos de tratamento, algumas das diferenças observadas em microscopia de luz foram confirmadas pela análise em microscopia eletrônica de transmissão, por meio desta técnica citoquímica. Os indivíduos CS apresentaram evidentes acúmulos de glicogênio hepático, diferentemente de DS, nos quais os estoques de carboidratos praticamente não foram observados. O treinamento físico, no entanto, não demonstrou efeitos expressivos entre os indivíduos controle, não havendo diferença notável. Em indivíduos DT, entretanto, alguns grânulos de glicogênio puderam ser observados, indicando recuperação proveniente da prática de exercícios (Figuras 14 e 15).

### 1.5.3. ANÁLISES BIOQUÍMICAS E MEDIDAS DE PESO

- Peso do Fígado

Os pesos dos fígados de todos os indivíduos foram agrupados em médias por grupo, e os dados, listados como média  $\pm$  desvio padrão, e sua respectiva análise estatística, foram apresentados na Tabela 2 e Figura 1.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, apenas entre CT e DT, sendo o peso hepático maior nos indivíduos sadios submetidos ao treinamento físico ( $p < 0,05$ ). No entanto, estes dados não foram suficientes para se determinar um padrão de alterações entre os grupos.

- Proteína/DNA

Os valores médios, para cada grupo, obtidos pelas análises de proteínas totais, DNA e a relação proteína/DNA, além de suas respectivas análises estatísticas, foram listados como média  $\pm$  desvio padrão e apresentados na Tabela 3 e Figura 2.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente relevantes entre os grupos de análise, com relação à quantidade de proteínas totais no fígado ( $p>0,05$ ).

Com relação ao DNA hepático, os indivíduos DS se mostraram significativamente diferentes dos indivíduos CS e CT, com maiores quantidades de material genético ( $p<0,05$ ). Da mesma forma, os indivíduos DT mostraram quantidades de DNA estatisticamente maiores que os indivíduos CS e CT ( $p<0,05$ ). O treinamento físico, contudo, tanto entre indivíduos controle, quanto entre indivíduos diabéticos, não se mostrou eficiente na alteração das quantidades de DNA hepático.

A relação proteína/DNA demonstrou diferenças estatísticas entre os indivíduos DS e os controles, tanto sedentários quanto treinados, com diminuição em seus valores ( $p<0,05$ ). Quanto às demais comparações, não foram encontradas diferenças entre os grupos ( $p>0,05$ ).



## 1.5.4. TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS

**Tabela 1.** Caracterização qualitativa dos resultados obtidos por meio das análises histoquímicas realizadas no fígado.

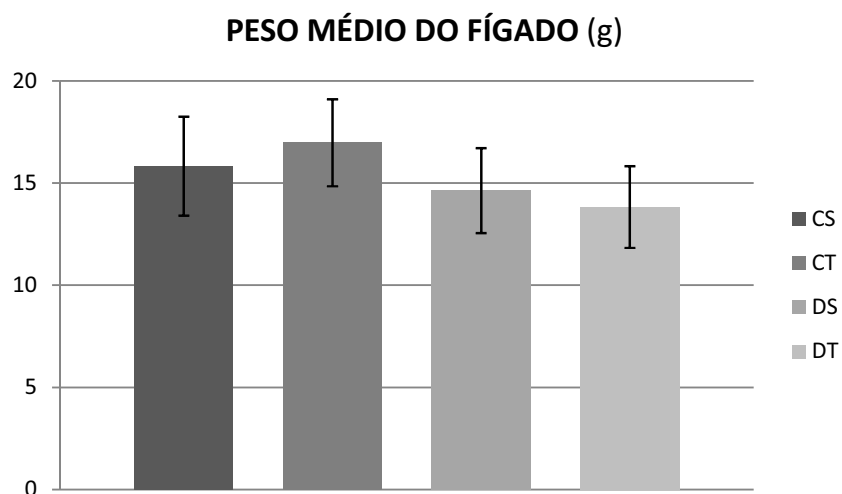
Análise histoquímica do fígado					
Técnica Histoquímica	Rato	Grupos			
		Controle Sedentário	Controle Treinado	Diabético Sedentário	Diabético Treinado
PAS	1	+++	++++	+	+++
	2	++++	++++	+	+++
	3	+++	++++	++	++++
PAS-Alcian Blue	1	+++	++	+	++
	2	++	++++	+	++
	3	+++	++++	++	+++
Picrosirius-Hematoxilina	1	++	+	++++	+++
	2	++	+	++++	+++
	3	++	++	++++	+++
Xilidine-Ponceau	1	++++	++++	++++	++++
	2	++++	++++	++++	++++
	3	++++	++++	++++	++++

**Legenda:** (+) Reação fraca com a técnica de coloração; (++) Reação moderada; (+++) Reação forte; (+++++) Reação intensa; (-) A estrutura não reagiu com a técnica utilizada.

**Tabela 2.** Peso do fígado (g) dos animais nos diferentes grupos de tratamento.

Peso Médio do Fígado (g)				
Parâmetro	Grupos			
	Controle Sedentário	Controle Treinado	Diabético Sedentário	Diabético Treinado
Peso do Fígado	15,832 ± 2,42	16,977 ± 2,13	14,629 ± 2,08	13,831 ± 2,00 <sup>b</sup>

**Legenda:** Valores expressos como média ± desvio padrão. a ≠ CS; b ≠ CT; c ≠ DS (ANOVA One-Way, *post-hoc* Bonferroni; p<0,05).

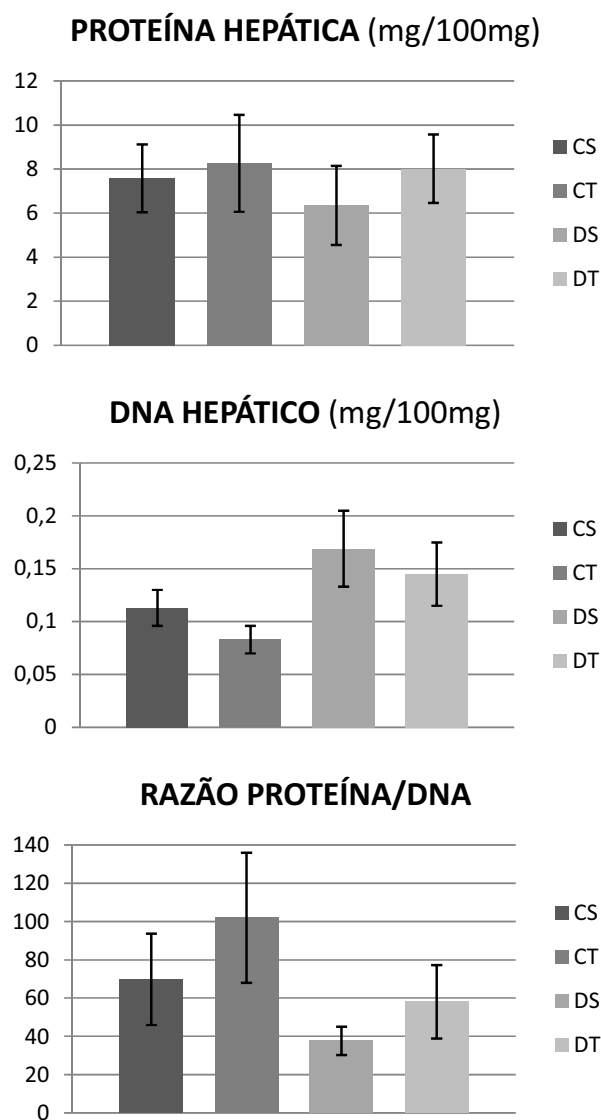


**Figura 1.** Peso do fígado (g) dos animais nos diferentes grupos de tratamento. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. a  $\neq$  CS; b  $\neq$  CT; c  $\neq$  DS (ANOVA One-Way, *post-hoc* Bonferroni;  $p < 0,05$ ).

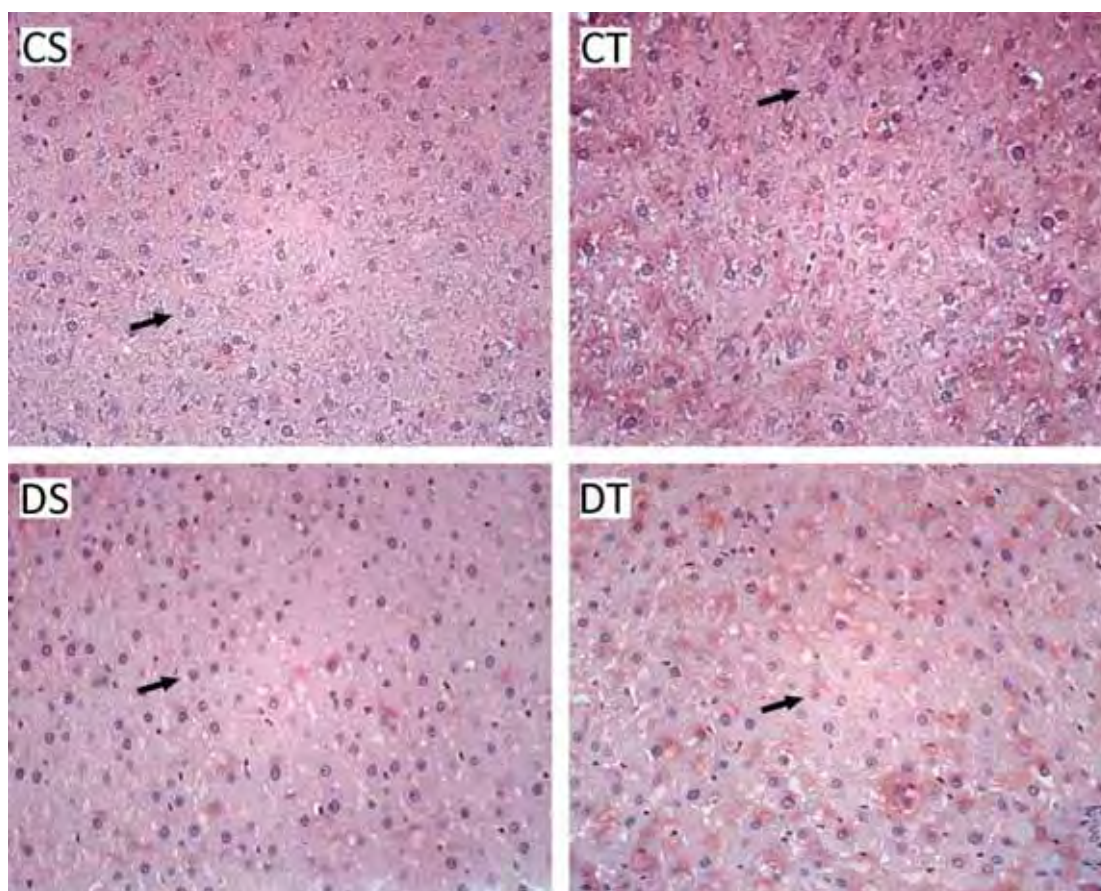
**Tabela 3.** Proteínas totais (mg/100mg), DNA hepático (mg/100mg) e razão proteína/DNA dos animais nos diferentes grupos de tratamento.

Proteína, DNA hepático, e razão Proteína/DNA				
Parâmetros	Grupos			
	Controle Sedentário	Controle Treinado	Diabético Sedentário	Diabético Treinado
Proteína hepática	7,578 $\pm$ 1,542	8,262 $\pm$ 2,203	6,348 $\pm$ 1,792	8,019 $\pm$ 1,552
DNA hepático	0,113 $\pm$ 0,017	0,083 $\pm$ 0,013	0,169 $\pm$ 0,036 <sup>a,b</sup>	0,145 $\pm$ 0,030 <sup>a,b</sup>
Razão Proteína/DNA	69,898 $\pm$ 23,853	102,072 $\pm$ 33,932	37,771 $\pm$ 7,346 <sup>a,b</sup>	58,140 $\pm$ 19,195

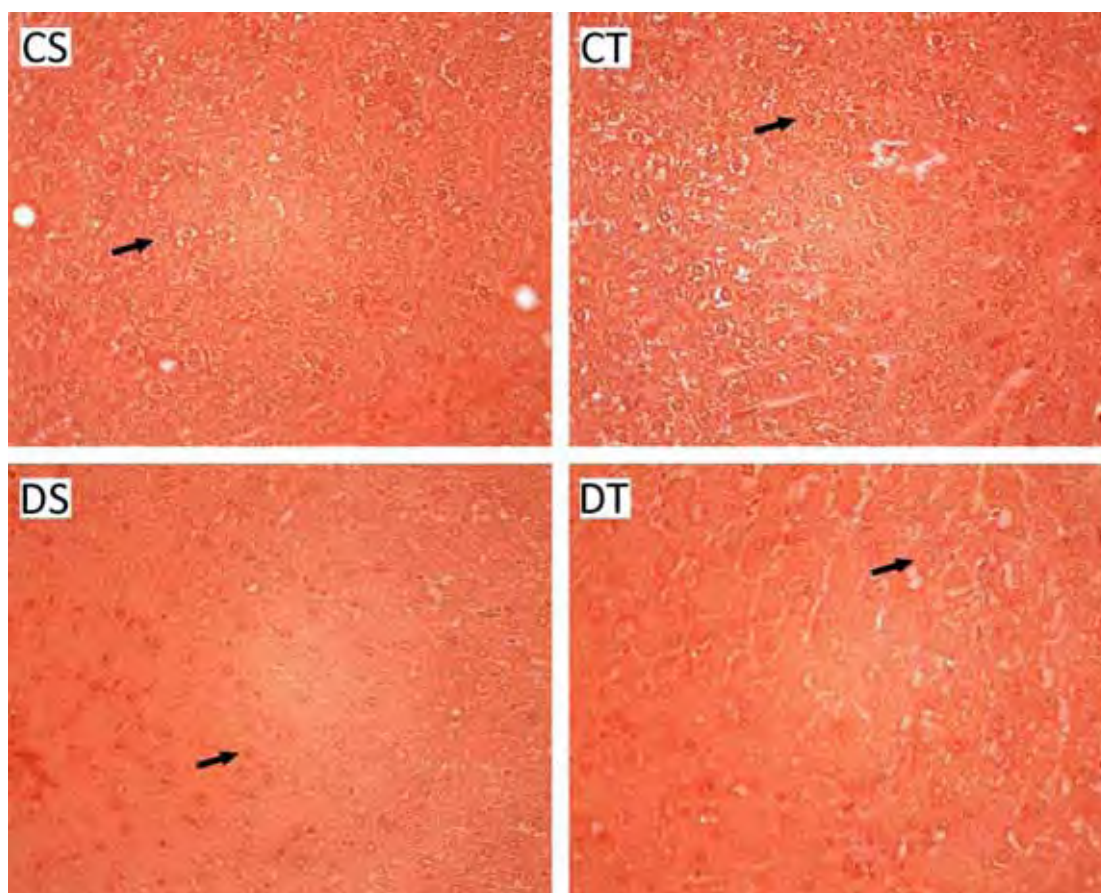
**Legenda:** Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. a  $\neq$  CS; b  $\neq$  CT; c  $\neq$  DS (ANOVA One-Way, *post-hoc* Bonferroni; Teste de Kruskal-Wallis, *post-hoc* Dunn;  $p < 0,05$ ).



**Figura 2.** Glicogênio hepático (mg/100mg), proteínas totais (mg/100mg), DNA hepático (mg/100mg) e razão proteína/DNA dos animais nos diferentes grupos de tratamento. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. a  $\neq$  CS; b  $\neq$  CT; c  $\neq$  DS (ANOVA One-Way, *post-hoc* Bonferroni; Teste de Kruskal-Wallis, *post-hoc* Dunn;  $p < 0,05$ ).

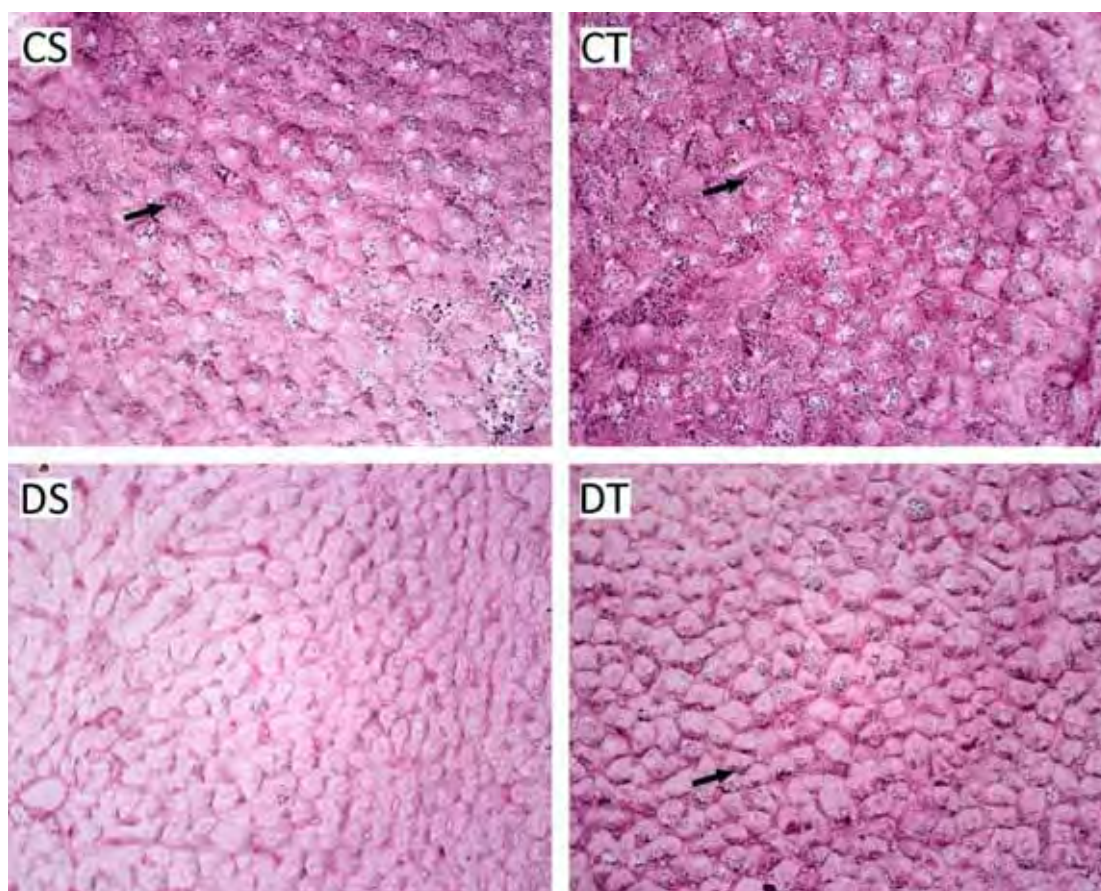


**Figura 3.** Vista geral do fígado, por meio da utilização da técnica de Hematoxilina-Eosina, permitindo a visualização dos hepatócitos (setas). Notar o aspecto granular do citoplasma de indivíduos controle, tanto sedentários quanto treinados. Aumento: 400x.

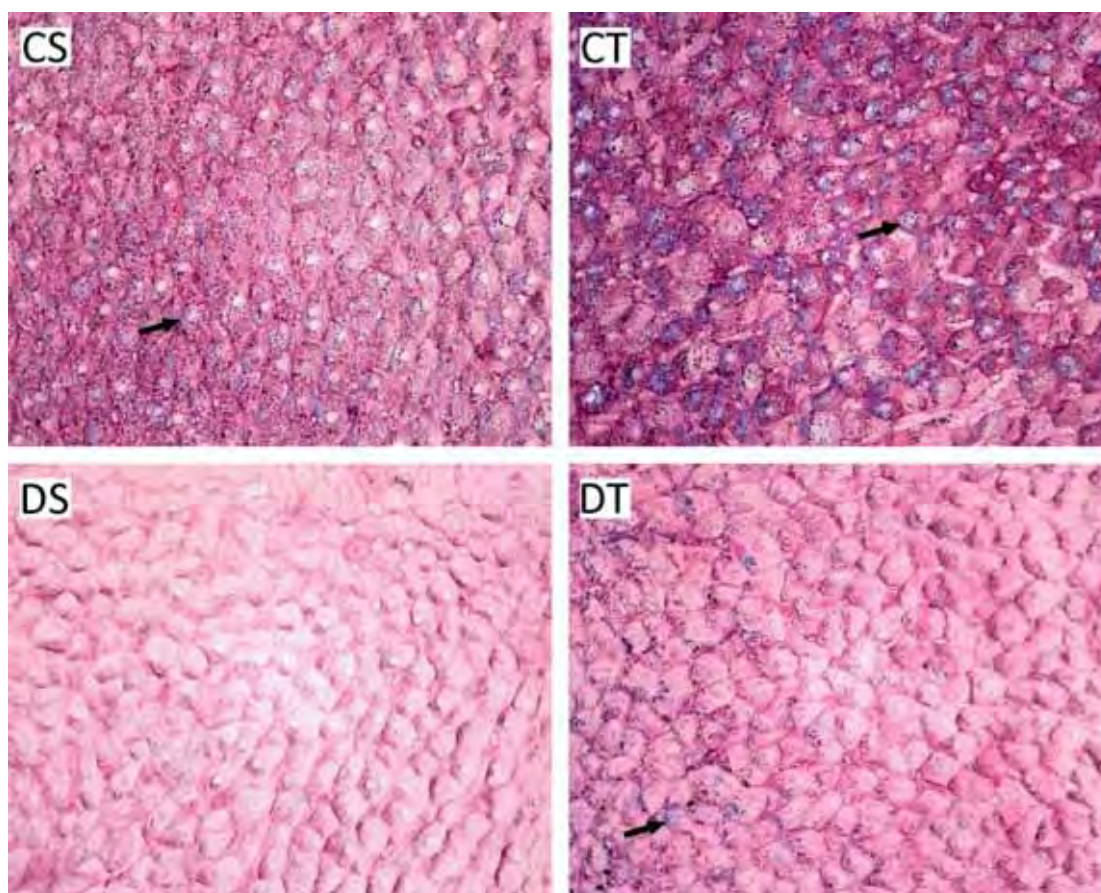


**Figura 4.** Hepatócitos corados com a técnica histoquímica Xilidine-Ponceau, que evidencia proteínas, em laranja. Notar que as intensidades de coloração dos indivíduos de todos os grupos não apresentam diferenças relevantes. Setas = Hepatócitos. Aumento: 400x.



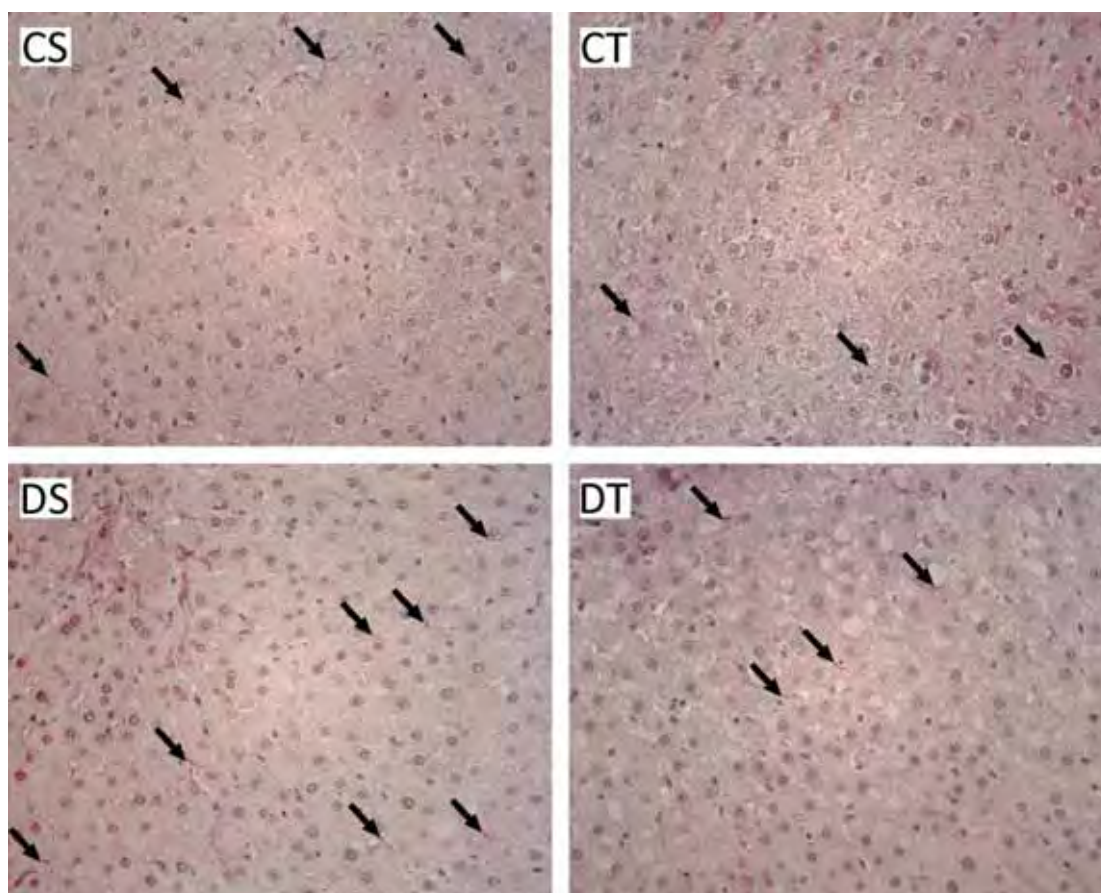


**Figura 5.** Reação de PAS, para carboidratos, corados em vermelho. Notar as diferentes intensidades de coloração entre os indivíduos CS e DS, e a aparente recuperação dos DT, resultante do treinamento físico. Os indivíduos treinados, CT e DT, apresentam elevações em seus estoques de glicogênio (setas), quando comparados aos sedentários, CS e DS. Aumento: 400x.



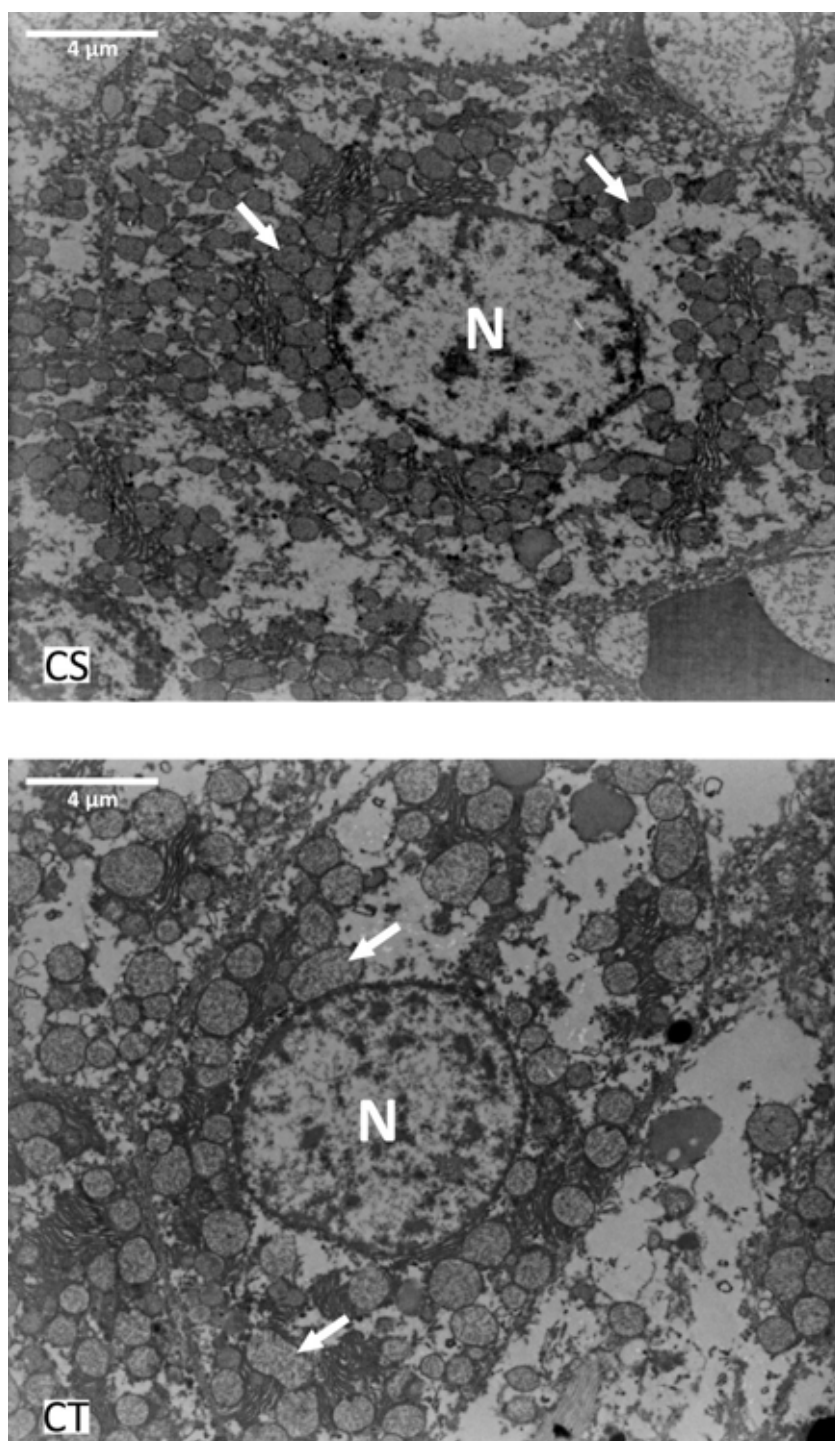
**Figura 6.** Técnica simultânea de PAS-Alcian Blue, para coloração de polissacarídeos ácidos em azul (setas), evidenciando hepatócitos fortemente corados nos grupos controle, mais intensamente em CT. Em indivíduos DS, praticamente não houve reação com a técnica. Os ratos DT, por sua vez, já apresentam leve acidez de carboidratos. Aumento: 400x.



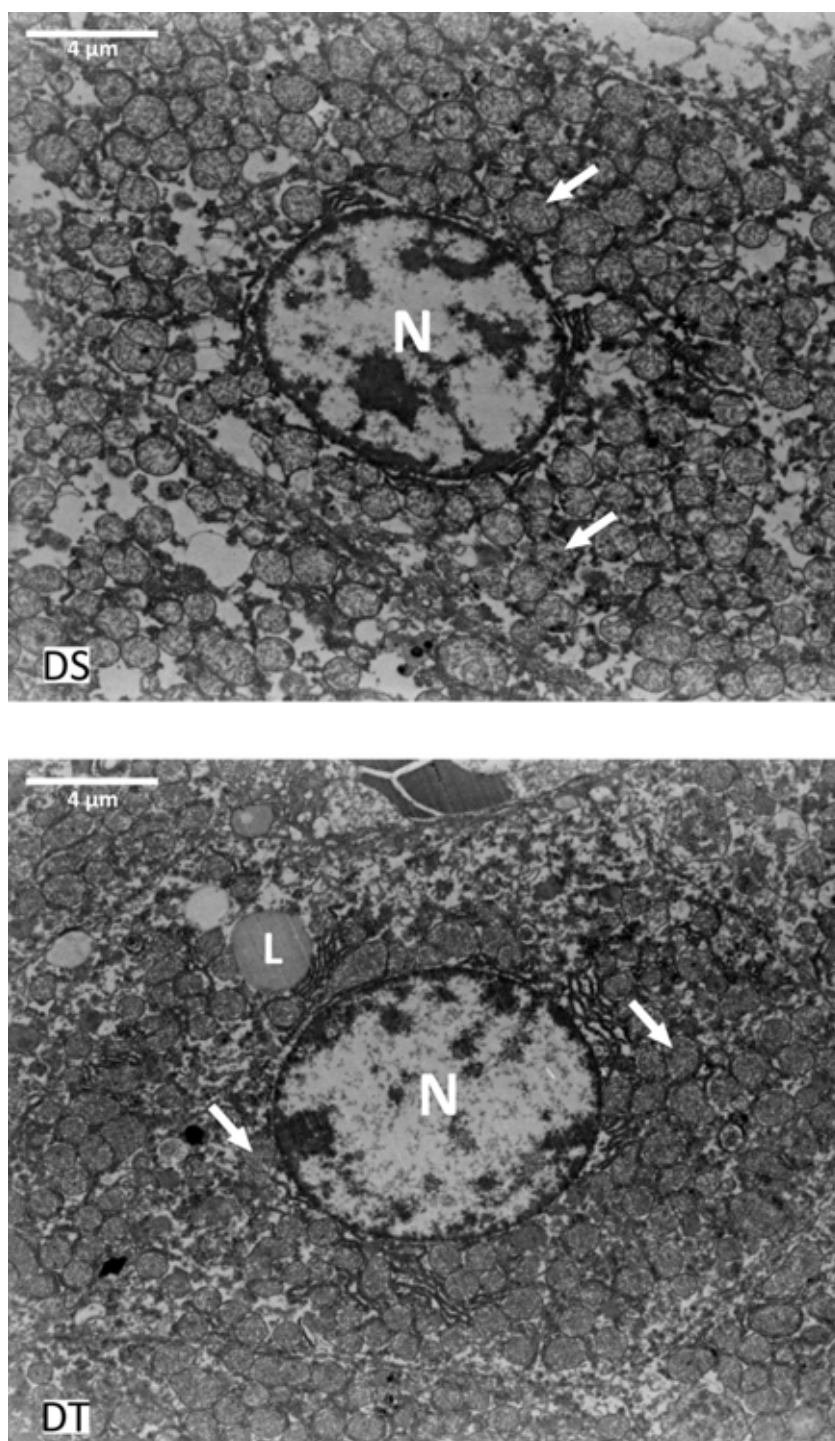


**Figura 7.** Hepatócitos corados pela técnica histoquímica Picrosirius-Hematoxilina, que reage com fibras colágenas totais no tecido, coradas em vermelho. Notar a maior intensidade de coloração e quantidade de espessamentos de fibras colágenas perisinusoidais nos indivíduos diabéticos (setas). O treinamento físico proporcionou leve diminuição na quantidade de fibras colágenas entre os grupos. Aumento: 400x.

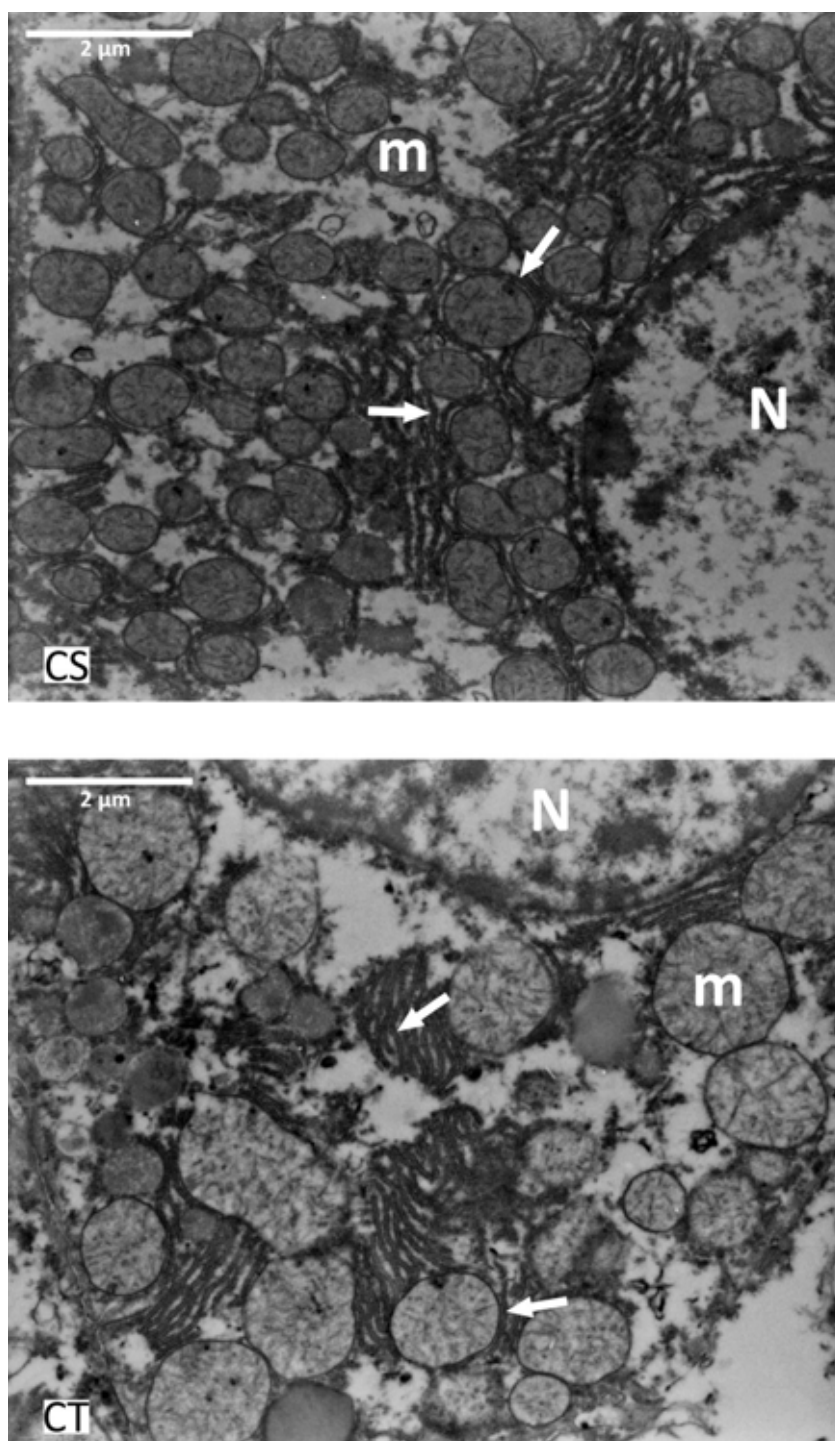




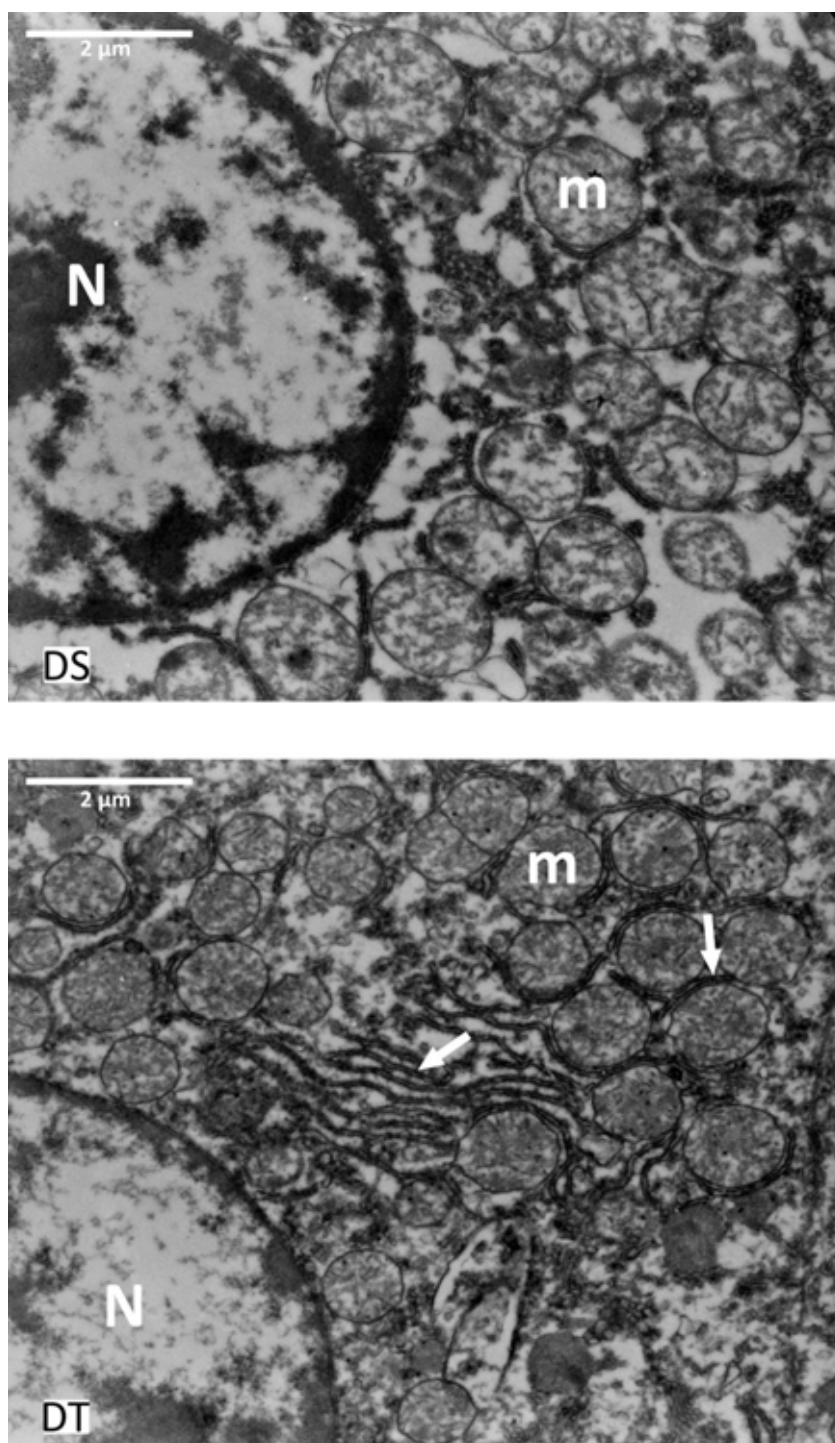
**Figura 8.** Aspecto geral dos hepatócitos de indivíduos controle, sedentários (CS) e treinados (CT). O exercício físico não promoveu mudanças significativas entre os grupos de tratamento. N = Núcleo; Seta = Mitocôndria. Barra: 4μm. Aumento: 4800x.



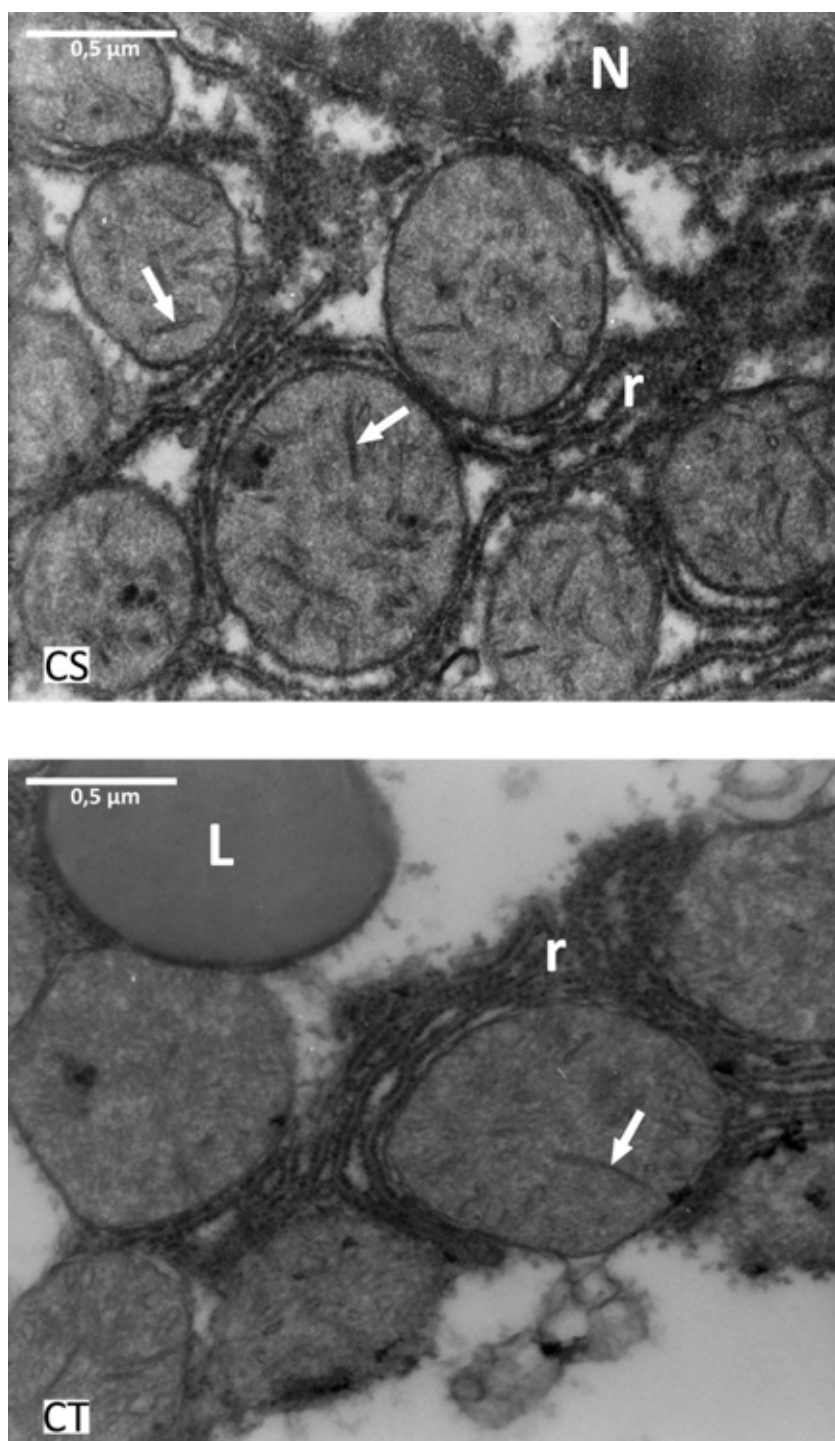
**Figura 9.** Aspecto geral dos hepatócitos de indivíduos diabéticos, sedentários (DS) e treinados (DT). Notar a grande quantidade de mitocôndrias preenchendo praticamente todo o citosol da célula. O treinamento físico não promoveu mudanças relevantes entre os grupos de tratamento. N = Núcleo; L = Gota de lipídio; Seta = Mitocôndria. Barra: 4μm. Aumento: 4800x.



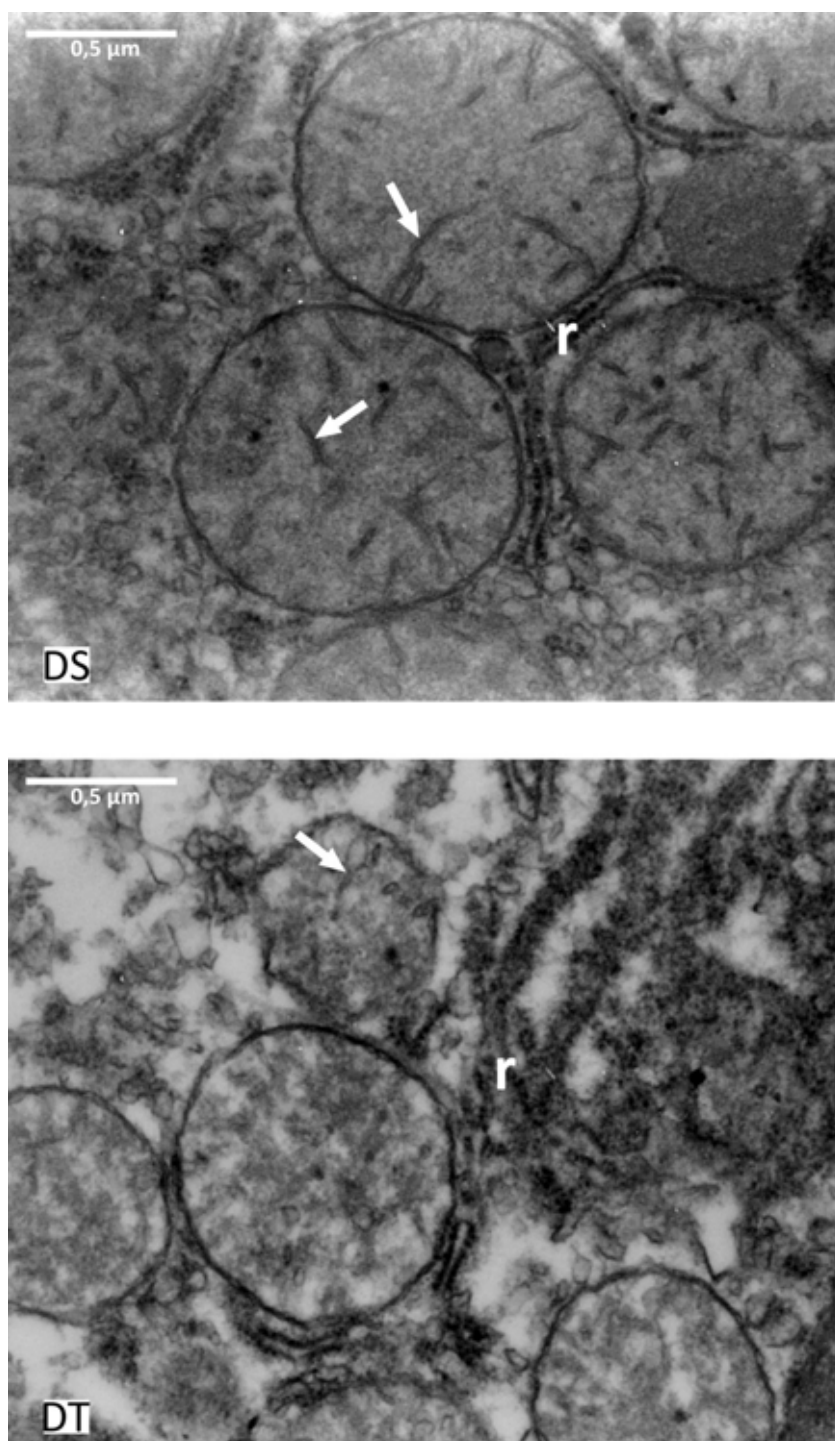
**Figura 10.** Detalhe do retículo endoplasmático rugoso (setas) nos hepatócitos de indivíduos controle, sedentários (CS) e treinados (CT). O treinamento físico não alterou as características dos hepatócitos neste quesito. N = Núcleo; m = Mitocôndria. Barra: 2μm. Aumento: 12050x.



**Figura 11.** Detalhe do retículo endoplasmático rugoso (setas) nos indivíduos diabético, sedentários (DS) e treinados (DT). Notar que as cisternas do RER encontram-se praticamente ausentes nos indivíduos DS. O treinamento físico permitiu a amenização dos efeitos do diabetes, tornando os indivíduos DT mais próximos dos controles. N = Núcleo; m = Mitocôndria. Barra: 2μm. Aumento: 12050x.

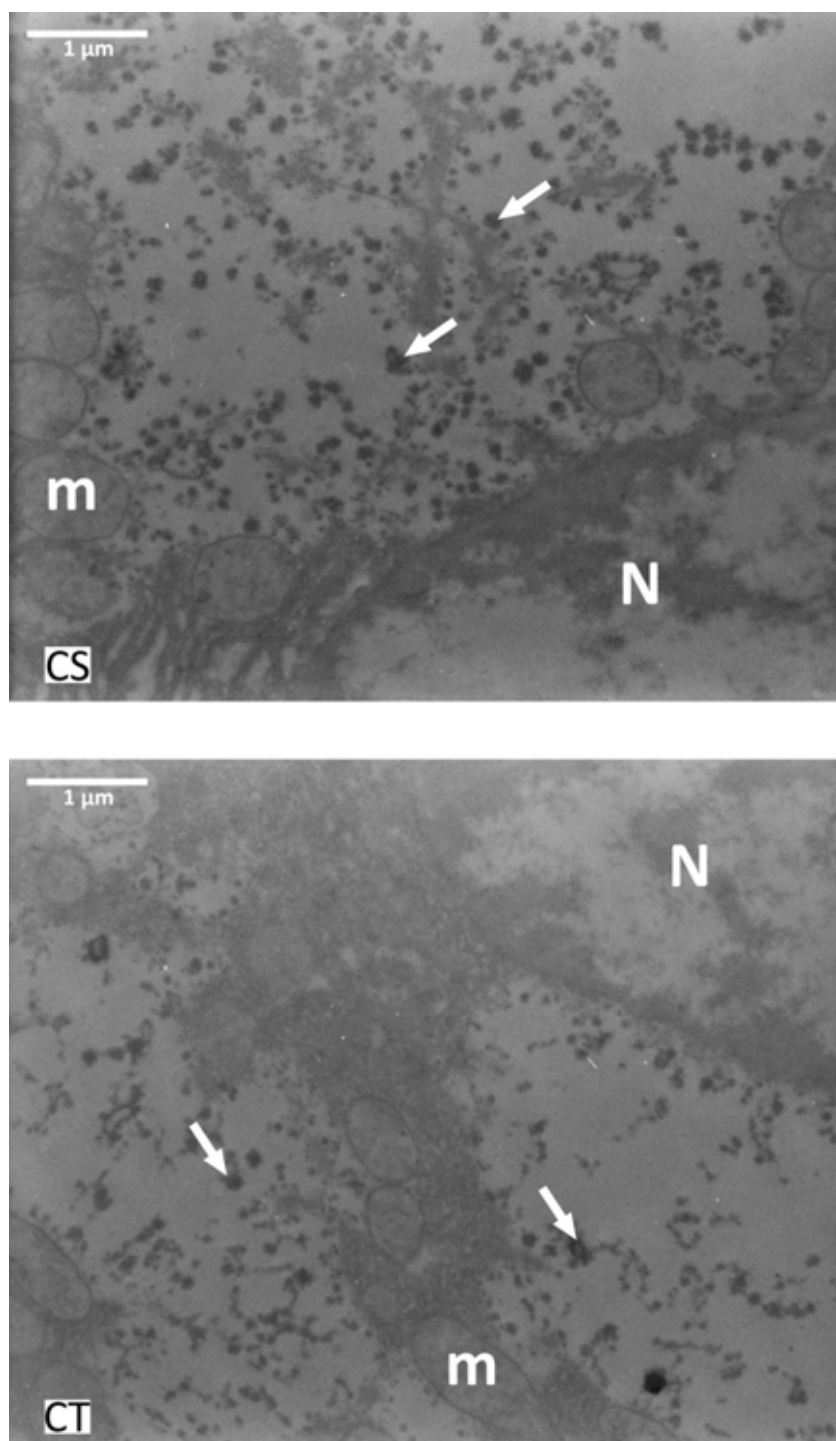


**Figura 12.** Detalhe das mitocôndrias dos hepatócitos de indivíduos controle, sedentários (CS) e treinados (CT). Nesta micrografia eletrônica é possível observar uma leve diminuição na quantidade de cristas mitocondriais (setas), fruto do treinamento físico. A matriz apresenta eletrondensidade semelhante em ambos os grupos de análise. N = Núcleo; r = Retículo Endoplasmático Rugoso. Barra: 0,5µm. Aumento: 43600x.

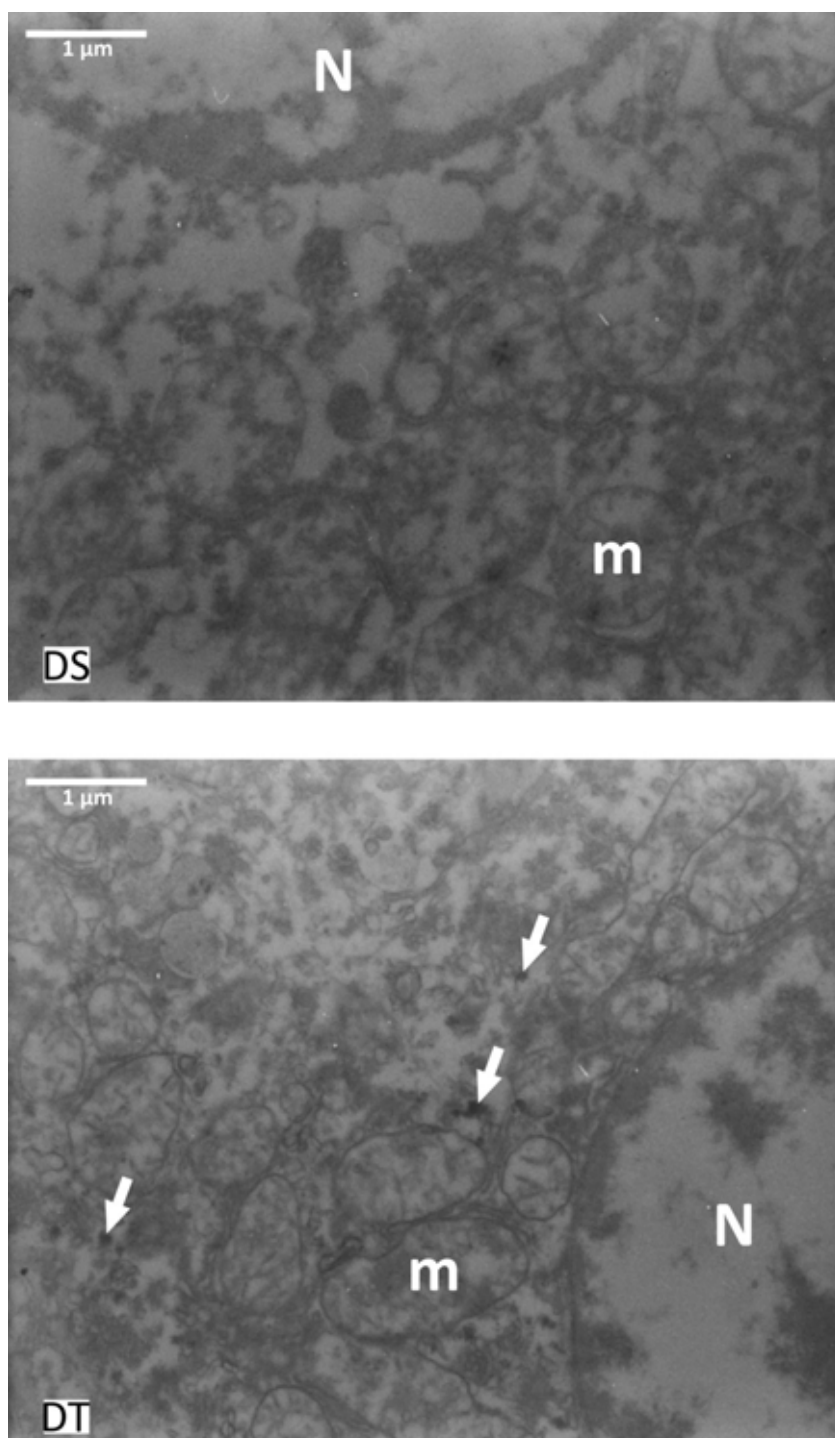


**Figura 13.** Detalhe das mitocôndrias dos hepatócitos de indivíduos diabéticos, sedentários (DS) e treinados (DT). Notar a diminuição relativa na quantidade de cristas (setas) em indivíduos DT. A matriz mitocondrial dos indivíduos DT, contudo, apresenta-se diferenciada de todos os outros grupos, com aspecto granuloso e menor eletrondensidade. r = Retículo Endoplasmático Rugoso. Barra: 0,5μm. Aumento: 43600x.





**Figura 14.** Teste citoquímico de Afzelius, para demonstração ultraestrutural de depósitos de glicogênio na célula, em indivíduos controle, sedentários (CS) e treinados (CT). Notar a grande quantidade de grânulos de glicogênio (setas) nos hepatócitos de ambos os grupos. O treinamento físico não resultou em diferenças entre os grupos analisados. N = Núcleo; m = Mitocôndria. Barra: 1µm. Aumento: 17450x.



**Figura 15.** Teste citoquímico de Afzelius, para demonstração ultraestrutural de depósitos de glicogênio na célula, em indivíduos diabéticos, sedentários (DS) e treinados (DT). Por meio da análise destas micrografias eletrônicas, é possível observar que não há a presença de depósitos granulares de glicogênio nos ratos DS. O treinamento físico, em DT, por sua vez, gerou alterações celulares importantes, evidenciadas pela presença de pequena quantidade de grânulos de glicogênio (setas). N = Núcleo; m = Mitocôndria. Barra: 1µm. Aumento: 17450x.



## 1.6. DISCUSSÃO

Ao longo dos anos, inúmeros estudos referentes aos prejuízos provenientes do diabetes mellitus tipo I vêm sendo desenvolvidos, e muitos dos seus sintomas no fígado já foram descritos. A hiperglicemia, sintoma característico de pacientes diabéticos tipo I, pode apresentar relação com as alterações hepáticas observadas conforme a doença progride (VALLANCE-OWEN, 1952; EVANS, LITTLER, PEMBERTON, 1955; MUNNS et al, 2000; ARKKILA et al, 2001; MARTOCCHIA et al, 2008; LEME et al, 2009). Os resultados obtidos no presente estudo permitem a confirmação de tais informações.

As técnicas histoquímicas realizadas neste estudo foram suficientes para que se tornasse possível inferir a respeito de importantes modificações nos hepatócitos e sinusóides hepáticos, comprovadas em parte pela literatura, principalmente em relação a alguns componentes produzidos pelas células, como carboidratos e proteínas, e presentes na matriz extracelular, como os colágenos totais.

A análise da técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E) não permitiu a observação de características diferenciais importantes e relevantes entre os grupos analisados, sendo utilizada apenas como método de observação dos aspectos gerais do órgão nos diferentes casos. Distinções quanto à acidez citoplasmática não foram observadas, não permitindo que se inferisse a respeito de alguma alteração em termos de atividade celular (indicada por uma maior acidez citoplasmática). No entanto, foram observadas diferenças notáveis quanto ao aspecto citoplasmático dos hepatócitos, sendo mais expressiva a presença de regiões de basofilia, que conferiu aspecto granular ao citoplasma, nos indivíduos controles, em relação aos diabéticos. O que se nota é que, nos indivíduos diabéticos treinados, o exercício físico favoreceu a recuperação, em partes, desta característica celular, tornando-a mais próxima à apresentada em indivíduos CS. Isso pode significar alguma melhora no estado diabético, mas literatura a respeito não foi encontrada, não permitindo, portanto, a comparação com outros resultados. Alterações, como diferenças de tamanho e forma, da célula e do núcleo, vacuolização celular ou inchaço citoplasmático, não foram observadas.

Por meio da análise ultraestrutural, contudo, foram revelados aspectos muito interessantes a respeito das características celulares dos hepatócitos. A quantidade de mitocôndrias em indivíduos DS, quando comparados aos CS, é visivelmente maior, preenchendo praticamente todo o conteúdo celular. Foi devido a este motivo que se observou citoplasma de aspecto homogêneo na microscopia de luz, sem a presença de regiões de basofilia citoplasmática, entre indivíduos diabéticos.

A maior quantidade de mitocôndrias pode ter um significado funcional importante no desenvolvimento do diabetes, indicando maior taxa de respiração celular e, portanto, maior demanda de ATP pela célula. Isso sugere a ocorrência de inúmeras reações químicas nestes indivíduos, em maior intensidade do que em indivíduos controle. Estas reações podem estar sendo representadas pela quebra do glicogênio em glicose, ou mesmo pela produção de glicose por meio da neoglicogênese, fato também confirmado pela menor quantidade de reservas de glicogênio nos hepatócitos. O treinamento físico, entretanto, não promoveu mudanças evidentes entre os grupos, não permitindo a observação de nenhuma alteração em nível celular. Possivelmente, o intervalo de tempo de realização do protocolo de exercícios físicos, responsável por importantes mudanças metabólicas e bioquímicas, não foi suficiente para que se pudesse observar alterações significativas em nível ultraestrutural.

Muitos estudos têm sido desenvolvidos para avaliar as alterações nas funções mitocondriais provenientes do desenvolvimento do diabetes e, segundo alguns deles, adaptações metabólicas nas mitocôndrias são comuns entre pacientes diabéticos como, por exemplo, a abertura de poros multiprotéicos nas membranas mitocondriais externa e interna, bem como mudanças na bioenergética mitocondrial (FERREIRA et al, 2003). De acordo com a literatura, nas fases iniciais e medianas do desenvolvimento do diabetes, as mitocôndrias hepáticas ainda são capazes de sintetizar ATP, embora com decréscimo na taxa de oxidação de substratos, enquanto que nas formas mais severas, prejuízos nas membranas mitocondriais e alteração da atividade de citocromos se tornam bastante evidentes (MATSUBARA et al, 1971; AGZAMOV et al, 1983).

Os resultados aqui observados, no entanto, não revelaram alterações estruturais nas membranas mitocondriais entre indivíduos controle e diabéticos sedentários, não condizendo com a literatura citada. Possivelmente, o curto prazo de desenvolvimento do diabetes, nos ratos analisados neste experimento, não permitiu a constatação de alterações morfológicas significativas entre os grupos sedentários. A estruturação equivalente das mitocôndrias, entre indivíduos sedentários, CS e DS, mostra que as possíveis mudanças na atividade de respiração celular, produção de ATP e, como consequência, a síntese ou quebra de compostos, se devem

principalmente às alterações na quantidade de mitocôndrias na célula, e não a uma maior eficiência na produção de energia por cada organela. O treinamento físico, por sua vez, tanto em controles quanto diabéticos, foi responsável pela diminuição na quantidade das cristas mitocondriais, indicando menor taxa metabólica por mitocôndria, em indivíduos treinados. O exato significado funcional destas alterações, no entanto, não foi encontrado na literatura, não permitindo a comparação com outros trabalhos.

A matriz mitocondrial não demonstrou diferenças entre os indivíduos CS, CT, e DS, não sendo notados, portanto, prejuízos na composição molecular desta região provenientes do desenvolvimento do diabetes. No entanto, foram observadas alterações entre o grupo DT e os demais grupos de tratamento, representadas pela menor eletrondensidade e maior granulação da matriz mitocondrial de diabéticos treinados. Isso pode significar sobrecarga mitocondrial hepática frente à prática de exercícios. Os possíveis efeitos do diabetes, não observados em indivíduos sedentários, podem ter sido acentuados a partir do aumento da função mitocondrial no desenvolvimento do protocolo de treinamento, gerando o aspecto granuloso e menos eletrondenso da matriz mitocondrial em ratos do grupo DT.

Os estudos a respeito das características protéicas em indivíduos diabéticos são relativamente contraditórios. Geralmente, a síntese de proteínas se mostra ligeiramente diminuída em diabéticos. Isso se deve principalmente ao elevado catabolismo protéico no diabetes inicial (BAHNAK; GOLD, 1982). A deficiência em insulina leva a marcadas reduções na síntese de proteínas hepáticas, particularmente a síntese de albumina e outras proteínas do plasma (REAVEN, PETERSON, REAVEN, 1973; JEFFERSON et al, 1983; LENK et al, 1992). Entretanto, a degradação de proteínas hepáticas não aumenta em ratos diabéticos induzidos por drogas, como a estreptozotocina. Não há, de acordo com dados experimentais, nenhuma evidência de mudança fundamental nas taxas relativas de síntese ou degradação de proteínas ácidas ou básicas (BOND, 1980).

Neste trabalho, as informações obtidas a partir da análise da técnica Xilidine-Ponceau, para proteínas, concordam com os resultados obtidos por Bond (1980). O diabetes não resultou em alterações relevantes, sendo sua intensidade de reação com a técnica muito semelhante à dos indivíduos controle. O exercício físico, por sua vez, também não resultou em melhoras no estado diabético, bem como não promoveu alterações em indivíduos controle.

Todavia, as observações em microscopia eletrônica revelaram importantes alterações na presença de cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER), encontradas geralmente ao redor das mitocôndrias, em indivíduos diabéticos, quando comparados aos controles. Em DS, a quantidade de RER observada no citosol é aparentemente menor do que em CS, sugerindo

menor síntese de proteínas, fato que condiz com os trabalhos de Bahnak; Gold (1982), Reaven; Peterson; Reaven (1973), Jefferson et al (1983), e Lenk et al (1992). No estado diabético, a alteração no balanço da síntese e degradação protéica resulta em perda de proteínas em muitos tecidos, incluindo o fígado. Tais perdas de proteínas hepáticas parecem ocorrer devido a efeitos combinados de redução na síntese e estímulo da degradação protéica, devido à falta de insulina no sangue (LENK et al, 1992). Observações ultraestruturais em indivíduos diabéticos revelaram que há uma redução substancial no RER no fígado de animais induzidos por estreptozotocina, bem como a perda de ribossomos livres e ligados à membrana do retículo (REAVEN, PETERSON, REAVEN, 1973; PAIN et al, 1974; LENK et al, 1992), características que corroboram os resultados aqui obtidos.

O treinamento físico, em indivíduos diabéticos, permitiu a elevação na quantidade observada de RER. Desta forma, indivíduos DT apresentaram maior semelhança ultraestrutural aos indivíduos CS, fato que evidencia a amenização dos efeitos deletérios oriundos do desenvolvimento do diabetes, sem controle glicêmico. Em indivíduos CT, o treinamento físico pouco alterou as características celulares dos hepatócitos, em relação à quantidade de cisternas visíveis do RER.

A análise bioquímica das proteínas totais do fígado, por sua vez, demonstrou que, estatisticamente, não existem diferenças significativas entre os grupos de tratamento, comprovando os resultados obtidos em Xilidíne-Ponceau. Pesquisas demonstram que animais diabéticos são capazes de aumentar a produção de proteínas frente ao treinamento físico. No entanto, parece haver uma concentração limítrofe de insulina, abaixo da qual o treinamento físico não é capaz de estimular a síntese protéica (FEDELE; LANG; FARREL, 2001). Não foi observado, neste experimento, o aumento na taxa de síntese de proteínas em virtude da prática de exercícios físicos em ratos diabéticos, possivelmente devido às baixas concentrações de insulina no sangue destes indivíduos.

Possivelmente, as alterações na taxa de síntese de proteínas podem ter sido tão mínimas que não puderam ser visualizadas através de coloração específica em histoquímica, nem fornecer diferenças estatísticas precisas entre os grupos de análise.

A análise da quantidade de DNA hepático revelou aspectos importantes no fígado diabético. Segundo os resultados estatísticos, os indivíduos diabéticos, tanto sedentários quanto treinados, apresentaram quantidades de DNA expressivamente maiores que os grupos controle (CS e CT). Isso sugere a ocorrência de hiperplasia no fígado, ou seja, aumento do número de células hepáticas. Este fato é comprovado, para os indivíduos DS, através da relação proteína/DNA, que revelou aumento nas quantidades relativas de ácidos nucleicos,

sem alterações nas características protéicas dos hepatócitos, ou seja, sem a evidência de hipertrofia. Pela redução significativa da razão proteína/DNA nos diabéticos, podemos inferir que houve redução do volume dos hepatócitos apesar da hiperplasia. Essa redução do volume poderia explicar a manutenção do peso do fígado frente à hiperplasia. O treinamento físico, contudo, não promoveu alterações entre indivíduos controle, bem como entre indivíduos diabéticos.

Inúmeros casos de hepatomegalia foram relatados ao longo dos anos (EVANS, LITTLER, PEMBERTON, 1955; FERRANNINI et al, 1990; MUNNS et al, 2000; TORRES, LÓPEZ, 2001; TOMIHIRA et al, 2004; ABACI et al, 2008), e suas causas relacionadas a diferentes concentrações de glicogênio hepático e lipídios nos indivíduos diabéticos, retratando as controversas opiniões a respeito do tema e demonstrando a ocorrência comum de variações no tamanho e peso do fígado de pacientes diabéticos. Estes aumentos característicos no fígado de pacientes com diabetes do tipo I, comumente relacionados ao acúmulo de lipídios, estariam relacionados à forte presença de massas de glicogênio no fígado, depositadas nas células hepáticas, possivelmente resultantes de longos períodos de hiperglicemia (EVANS, LITTLER, PEMBERTON, 1955; CHATILA, WEST, 1996). Entretanto, no presente estudo, não foram encontradas evidências da ocorrência de hepatomegalia, ou seja, não foram observadas diferenças estatísticas relevantes no peso do fígado entre os grupos de tratamento. Apenas o peso hepático dos indivíduos CT foi considerado estatisticamente maior que o de DT, mas não foi possível o estabelecimento, a partir destes dados, de um padrão de alterações que estariam ocorrendo no fígado diabético e alterando, assim, seu tamanho e peso. Estes resultados podem ter apenas representado alterações provenientes de diferenças amostrais.

Os estoques de glicogênio no fígado de pacientes diabéticos têm sido variavelmente descritos como baixos, normais ou elevados, não havendo consenso entre os estudos. Esta confusão pode refletir as condições nas quais as amostras foram obtidas ou o tipo de pacientes estudados (CLORE et al, 1992). De qualquer forma, em contraste com indivíduos normais, o processamento de carboidratos é marcadamente distorcido em pacientes diabéticos tipo I com pobre controle glicêmico (AOKI et al, 1983). No entanto, segundo alguns autores, não está claro, por uma grande variedade de razões, se as alterações nas taxas máximas de acúmulo de glicogênio hepático em diabéticos são realmente significativas (WHITTON; HEMS, 1975).

Pesquisas na literatura indicam opiniões favoráveis a um estoque reduzido de glicogênio no fígado de pacientes com diabetes mellitus tipo I, e observações em experimentações animais suportam estas descobertas (VALLANCE-OWEN, 1952). Em

animais com diabetes causado por deficiência em insulina, prejuízos na tolerância à glicose são parcialmente atribuídos a alterações no metabolismo hepático, incluindo produção excessiva de glicose pela gliconeogênese. A alta concentração de glicose no diabetes é comumente associada com a diminuição no conteúdo de glicogênio hepático, implicando em um defeito no acúmulo ou retenção de glicogênio no fígado (WHITTON; HEMS, 1975). A deficiência em insulina e o excesso de glucagon observados no estado diabético afetam as enzimas glicogenolíticas e glicogênicas de forma que se espere que os estoques de glicogênio sejam menores (CLORE et al, 1992).

Por meio da análise qualitativa dos estoques de glicogênio hepático, através da técnica PAS, no presente trabalho, modificações relevantes foram visualizadas nos hepatócitos de indivíduos diabéticos, e alguns dos trabalhos anteriormente citados corroboram estes resultados. De acordo com os resultados obtidos, os indivíduos diabéticos sedentários, quando comparados aos controle sedentários, apresentaram redução drástica nos níveis de glicogênio hepático, confirmando os resultados descritos em estudos como os de Vallance-Owen (1952), e Whitton, Hems (1975). Desta forma, observando-se as características histoquímicas do fígado de indivíduos diabéticos tipo I sem controle glicêmico, pode-se sugerir que a atividade enzimática responsável pelo estoque energético na forma de glicogênio hepático estaria prejudicada, diferentemente de indivíduos não diabéticos, que mantiveram níveis considerados normais de reservas energéticas de carboidratos. Este fato pode ser devido tanto a elevações na quebra do glicogênio do fígado, como diminuição nas taxas de síntese destes compostos, provavelmente resultantes da hiperglicemia característica do diabetes. A quebra do glicogênio, em diabéticos, liberaria maior quantidade de açúcares no sangue, elevando ainda mais a hiperglicemia, e gerando ainda mais prejuízos ao fígado e a todo o organismo. Estas constatações, contudo, podem estar relacionadas ao tempo de desenvolvimento da doença, visto que estes indivíduos podem ser comparados aos diabéticos de curto prazo, concordando, portanto, com os trabalhos de Ferraninni et al (1990) e Clore et al (1992).

Entretanto, a revisão de dados clínicos e experimentais revelou que a baixa quantidade de glicogênio em diabéticos é mais uma exceção do que uma regra (FRIEDMAN; GOODMAN; WEINHOUSE, 1963). Estudos recentes com animais sugeriram que estes estoques reduzidos de glicogênio hepático ocorrem largamente em animais com diabetes agudo, e que este defeito é revertido nos diabéticos crônicos deficientes em insulina (tipo I) (FERRANNINI et al, 1990; CLORE et al, 1992). De acordo com alguns trabalhos, a glicogênio sintase, enzima responsável pela conversão de glicose em glicogênio no fígado, sofre aumento muito grande em sua atividade, devido à elevação em sua taxa de síntese nos

hepatócitos, no início do diabetes (BAHNAK; GOLD, 1982). Em diabéticos de curto prazo, no entanto, a quantidade de glicogênio sintase em sua forma ativa pode ser considerada menor, diferentemente de diabéticos de longo prazo, nos quais sua quantidade foi significativamente maior que em controles (FERRANNINI et al, 1990). Desta forma, contrariamente a outros trabalhos, o fígado apresentaria estoques mais elevados de glicogênio (um tipo de glicogenose hepática), fato confirmado por relatos de casos de pacientes diabéticos tipo I que apresentaram hepatócitos que reagiram fortemente com o PAS (HOFFMAN, YONG, LI, 2003; TORBENSON, 2006; ABACI et al, 2008). A glicogenose hepática é a resposta hepática para o pobre controle glicêmico em crianças, adolescentes e adultos com diabetes tipo I, e se desenvolve devido à necessidade de insulina, que aparece como resultado de um pobre controle metabólico (MUNNS et al, 2000). O nível de glicogênio hepático é mantido pelo balanço entre glicogênese e glicogenólise. A glicose sanguínea e os níveis de insulina geralmente demonstram flutuações em pacientes diabéticos com pobre controle metabólico, que apresentam freqüentemente ataques hipo ou hiperglicêmicos. Estas flutuações alteram o equilíbrio entre glicogênese e glicogenólise e causam a glicogenose hepática em pacientes diabéticos (ABACI et al, 2008). O acúmulo de glicogênio em pacientes com diabetes instável ocorreria, portanto, como resultado de um fluxo passivo de glicose, independente de insulina, para o interior do hepatócito. Desta forma, a síntese de glicogênio hepático seria promovida pela alta concentração citoplasmática de glicose e baixa de insulina (MUNNS et al, 2000). De acordo com um estudo mais antigo, no entanto, as diferentes quantidades de glicogênio, observadas nos pacientes diabéticos analisados, se explicariam pelas diferenças na quantidade de insulina circulante no sangue destes indivíduos. Aqueles que apresentaram quantidade normal ou elevada de glicogênio hepático provavelmente tinham quantidades apreciáveis de insulina no sangue, ou mesmo alto teor de açúcares, que também podem causar elevação do glicogênio hepático (VALLANCE-OWEN, 1952).

Com relação à prática regular e periódica de exercícios físicos, em indivíduos controle, foi possível observar pequena elevação nos níveis de glicogênio celular. Em indivíduos diabéticos treinados também foi possível notar que os estoques de glicogênio hepático apresentaram elevação em sua quantidade, quando comparados aos diabéticos sedentários, tornando-se semelhantes aos indivíduos controle sedentários e, portanto, sugerindo uma possível melhora nas condições de indivíduos diabéticos, proveniente da prática de exercícios físicos. A re-síntese de glicogênio foi estudada no fígado de ratos Wistar após a realização de natação, durante 30 minutos. Durante a recuperação pós-exercício, foi observado aumento nas quantidades de glicogênio hepático (BLAWACKA; KARÓN; ROTH, 1978). Isso explicaria

os resultados obtidos, evidenciando melhora na retenção dos estoques de glicogênio hepático em indivíduos diabéticos, semelhante a indivíduos saudáveis. Além disso, também foi demonstrado aumento da quantidade de glicogênio hepático em ratos submetidos ao treinamento físico de natação, quando comparados a animais sedentários (GOBATTO, 1993; LEME et al, 2007). A elevação dos estoques de carboidratos no fígado de indivíduos treinados pode sugerir menor produção de glicose, reduzindo os efeitos prejudiciais da hiperglicemia.

No entanto, alguns estudos postularam que a produção de glicose hepática, responsável pela ocorrência de hiperglicemia, é induzida pelo glucagon e estimulada por um período prévio de exercícios, indicando uma sensibilidade aumentada do fígado ao glucagon durante o treinamento (BONJORN et al, 2002). Poucos trabalhos têm se dedicado para a forma pela qual o fígado modula a ação do glucagon durante o exercício, embora a contribuição do glucagon no aumento da produção de glicose hepática seja bem reconhecida. Alguns estudos determinaram que fígados de indivíduos treinados apresentam respostas melhores à infusão de glucagon do que indivíduos não treinados. Em exercícios crônicos e breves, a produção de glicose hepática, promovida pela quebra do glicogênio e induzida pela hiperglucagonemia, é estimulada, sugerindo sensibilidade aumentada ao glucagon durante o exercício (BONJORN et al, 2002). Desta forma, a ação do exercício físico no fígado seria responsável pela característica diminuição nos estoques de glicogênio, resultado contrário ao observado neste experimento. Isso reflete as diferenças que podem ser observadas quando são realizados protocolos de treinamento físico distintos. Neste experimento, a prática de exercícios moderados e periódicos, durante um período de tempo maior, permitiu a recuperação dos estoques de carboidratos no fígado.

A observação em microscopia eletrônica de transmissão, através da técnica citoquímica de Afzelius, comprovou os resultados obtidos por meio da análise histoquímica das reservas de carboidratos do fígado. Em indivíduos controle, foi observada quantidade expressivamente maior de regiões de acúmulo de glicogênio, indicando a perda deste constituinte celular durante o desenvolvimento do diabetes tipo I sem controle glicêmico. Entretanto, estudos ultraestruturais revelaram forte presença de glicogênio citoplasmático agrupado em regiões específicas, empurrando as organelas para a periferia das células hepáticas em indivíduos diabéticos (CHATILA, WEST, 1996; TORBENSON et al, 2006). Como dito anteriormente, estas diferenças podem refletir os tipos de pacientes estudados, bem como o estágio do diabetes e as condições nas quais as amostras foram obtidas.



O desenvolvimento de um protocolo de treinamento físico periódico, por sua vez, confirmou ultraestruturalmente os resultados obtidos a partir da análise histoquímica. A recuperação observada em indivíduos DT também foi notada em nível celular, confirmando os benefícios provenientes da prática de exercícios em indivíduos diabéticos sem aplicação de insulina.

A análise da técnica PAS-Alcian Blue demonstrou resultados bastante semelhantes aos resultados obtidos no PAS. Este método histoquímico permite que sejam visualizadas diferenças em termos de acidez de polissacarídeos. Os indivíduos diabéticos sedentários praticamente não apresentaram reação com esta técnica histoquímica, visto que praticamente não contêm carboidratos em seus hepatócitos. O exercício físico, em indivíduos diabéticos, permitiu leve aumento na acidez de carboidratos, provavelmente pela aparente maior presença de polissacarídeos intracelulares. Os indivíduos controle treinados foram os que apresentaram maiores níveis de acidez entre os grupos, tornando possível, portanto, a correlação deste fato com a prática de um protocolo de treinamento físico. Este seria responsável pelo aumento na acidez de polissacarídeos no citoplasma dos hepatócitos. Neste caso, a acidez de polissacarídeos estaria representando, provavelmente, apenas distinções entre tipos de cadeias de açúcares, mas não é possível sugerir um significado funcional destas mudanças, visto que não foram encontrados estudos a este respeito na literatura.

A fibrose perisinusoidal é uma lesão vascular observada no fígado de pacientes diabéticos tipo I (BERNUAU et al, 1985). Um caso particular foi relatado, evidenciando extensa fibrose nos sinusóides hepáticos, relacionada à deposição de colágeno do tipo I, sem evidências de esteatose, em um paciente diabético tipo I. Isso sugere que o diabetes por si só pode ser considerado um importante fator patogênico na fibrose perisinusoidal, que pode ser comparada equivalentemente à microangiopatia diabética em outros locais. A fibrose hepática nos sinusóides, sem associação com esteatohepatite, tem sido fortemente associada com a ocorrência de diabetes (MCGRATH; YEONG, 2000). No entanto, segundo alguns trabalhos, a lesão fibrótica é independente da presença de diabetes, sugerindo que a fibrose perisinusoidal hepática em pacientes diabéticos tipo I pode estar ligada à predisposição genética ao invés da hiperglicemia propriamente dita. De qualquer forma, não se pode excluir a possibilidade de que a hiperglicemia em indivíduos geneticamente suscetíveis pode agravar a fibrose, aumentando o número de moléculas de colágeno glicosiladas, por exemplo (BERNUAU et al, 1985).

A análise da técnica Picrosirius-Hematoxilina, que evidencia as fibras colágenas totais, revelou aspectos bastante importantes no que diz respeito ao aparecimento de regiões

fibróticas no tecido. Os indivíduos diabéticos sedentários, quando comparados aos controle sedentários, demonstraram a forte presença de regiões de espessamento de fibras colágenas, ao redor dos hepatócitos, indicando provável ocorrência de fibrose. A colagenização do espaço perisinusoidal de Disse foi mostrada como representante de um novo aspecto de anormalidades microvasculares associadas com diabetes humano tipo I, dependente de insulina. Esta lesão vascular do fígado, caracterizada por uma abundância anormal de depósitos de fibras colágenas no espaço de Disse, foi freqüentemente encontrada em pacientes diabéticos, e consiste, principalmente, de espessamentos irregularmente localizados de fibras colágenas ao longo da parede do sinusóide (BERNUAU et al, 1985; MCGRATH, YEONG, 2000). No entanto, o relato de caso de um paciente diabético, cuja biópsia demonstrou arquitetura anormal do fígado, sem aumento do tecido fibrótico, discorda dos estudos relatados anteriormente (CUTHBERTSON et al, 2007).

O treinamento físico periódico, nos indivíduos controle (CT), permitiu a observação de reação menos intensa com esta técnica histoquímica, evidenciando menor quantidade de fibras colágenas, na região em questão, além da aparente diminuição do número de regiões de espessamento em relação aos controle sedentários. A prática de exercícios físicos, em indivíduos diabéticos (DT), por sua vez, também proporcionou melhora no quadro fibrótico, evidenciando seus benefícios em indivíduos com diabetes tipo I na redução do risco de fibrose, amenizando os efeitos deletérios da doença.

## 1.7. CONCLUSÃO

Os efeitos prejudiciais provenientes do desenvolvimento do diabetes tipo I sem controle glicêmico foram detectados com grande frequência no fígado de ratos induzidos por aloxana. Este fato está relacionado principalmente às quantidades reduzidas nos estoques de glicogênio nos hepatócitos, à provável tendência à ocorrência de fibrose hepática e às alterações celulares observadas em indivíduos diabéticos, principalmente relacionadas à provável diminuição na síntese protéica e aumento nas quantidades de mitocôndrias.

A prática regular de exercícios físicos, contudo, mostrou-se muito importante no tratamento de indivíduos diabéticos do tipo I, sendo responsável pela amenização ou prevenção dos prejuízos originados a partir do desenvolvimento da doença, elevando os estoques de glicogênio hepático, reduzindo o risco de fibrose perisinusoidal e permitindo a recuperação das características celulares dos hepatócitos, tornando-os mais próximos dos encontrados em indivíduos sadios sedentários.

## 1.8. BIBLIOGRAFIA

- ABACI, A. et al. Hepatic glycogenosis: a rare cause of hepatomegaly in Type 1 diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v.22, p.325-328, 2008.
- AFZELIUS, B.A. Section staining for electron microscopy using tannic acid as a mordant a simple method for visualization of glycogen and collagen. **Microsc Res Tech**, v.21, p.65-72, 1992.
- AGZAMOV, K.H. et al. Function of liver mitochondria in alloxan diabetes. **Voprosy Meditsinskoi Khimii**, v.29, n.1, p.61-66, 1983.
- ANGERMULLER, S.; FAHIMI, H.D. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. **Histochemical Journal**, v.14, p.823-35, 1982.
- AOKI, T.T. et al. Evidence for Restoration of Hepatic Glucose Processing in Type I Diabetes Mellitus. **J. Clin. Invest.**, v.71, p.837-839, 1983.
- ARKKILA, P.E.T. et al. Diabetic complications are associated with liver enzyme activities in people with type 1 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.52, p.113-118, 2001.
- BAHNAK, B.R.; GOLD, A.H. Effects of alloxan diabetes on the turnover of rat liver glycogen synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.257, n.15, p.8775-8780, 1982.
- BALÁZS, M.; HALMOS, T. Electron microscopic study of liver fibrosis associated with diabetes mellitus. **Experimental Pathology**, v.27, n.3, p.153-162, 1985.
- BERNUAU, D. et al. Liver Perisinusoidal Fibrosis in BB Rats With or Without Overt Diabetes. **A.J.P.**, v.120, n.1, p.38-44, 1985.

- BLAWACKA, M.; KARÓN, H.; ROTH, Z. Glycogen resynthesis in the rat muscle and liver after physical exercise. **Acta Physiol. Pol.**, v.29, n.6, p.521-530, 1978.
- BOND, J.S. Failure to demonstrate increased protein turnover and intracellular proteinase activity in livers of mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*, v.29, n.8, p.648-654, 1980.
- BONJORN, V.M. et al. Influence of prior exercise and liver glycogen content on the sensitivity of the liver to glucagon. **J. Appl. Physiol.**, v.92, p.188-194, 2002.
- CHATILA, R.; WEST, A.B. Hepatomegaly and abnormal liver tests due to glycogenosis in adults with diabetes. **Medicine**, v.75, n.6, p.327-333, 1996.
- CLORE, J.N. et al. Evidence for increased liver glycogen in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus after a 3-day fast. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.74, n.3, p.660-666, 1992.
- CUTHBERTSON, D.J. et al. Hepatic glycogenosis - abnormal liver function tests in Type 1 diabetes. **Diabetic Medicine**, v.24, p.322-328, 2007.
- DUBOIS, B. et al. Calorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.
- EVANS, R.W.; LITTLER, T.R.; PEMBERTON, H.S. Glycogen storage in the liver in diabetes mellitus. **Journal of Clinical Pathology**, v.8, p.110-113, 1955.
- FEDELE, M.J.; LANG, C.H.; FARREL, P.A. Immunization against IGF-1 prevents increases in protein synthesis in diabetic rats after resistance exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.280, p.E877-885, 2001.
- FERRANNINI, E. et al. Influence of long-term diabetes on liver glycogen metabolism in the rat. **Metabolism**, v.39, n.10, p.1082-1088, 1990.
- FERREIRA, F.M. et al. Diabetes induces metabolic adaptations in rat liver mitochondria: role of coenzim Q and cardiolipin contents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1639, p.113-120, 2003.
- FRIEDMAN, B.; GOODMAN, E.H.; WEINHOUSE, S. Liver glycogen synthesis in intact alloxan diabetic rats. **The Journal of Biological Chemistry**, v.238, n.9, p.2899-2905, 1963.

- GIANNINI, C. et al. Role of physical exercise in children and adolescents with diabetes mellitus. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v.20, n.2, p.173-184, 2007.
- GILES, K.W.; MAYERS, A. An improved diphenylamine method for the estimation of Deoxyribonucleic Acid. **Nature**, v.206, n.4975, p.93, 1965.
- GOBATTO, C. A. **Alterações metabólicas decorrentes do treinamento físico em ratos previamente desnutridos e recuperados**. Campinas, 122p, 1993. [Tese de Mestrado - IB-UNICAMP].
- HOFFMAN, S.D.; YONG, S.; LI, S.D. Poorly controlled type I diabetes mellitus associated with liver glycogen deposition and abnormal liver enzymes. **A.J.G.**, v.98, n.9, p.204, 2003.
- JAMIESON, A. Deranged liver function tests in type 1 diabetes mellitus: an unusual presentation of *Treponema pallidum* infection. **European Journal of Internal Medicine**, v.14, n.2, p.113-115, 2003.
- JEFFERSON, L.S. et al. Diabetes-induced Alterations in Liver Protein Synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.258, n.2, p.1369-1375, 1983.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ª Edição, Editora Guanabara Koogan, 2008.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Editora Santos, 1983.
- LEME, J.A.C.A. et al. Effects of short-term physical training on the liver IGF-I in diabetic rats. **Growth factors**, v.25, n.1, p.9-14, 2007.
- LEME, J.A.C.A. et al. Long-term physical training increases liver IGF-I in diabetic rats. **Growth Hormone and IGF Research**, v.19, p.262-266, 2009.
- LENK, S.E. et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes on rough endoplasmic reticulum and lysosomes of rat liver. **The American Physiological Society**, p.E856-E862, 1992.
- LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the folinphenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

- MARTOCCHIA A. et al. Association of diffuse liver glycogenosis and mild focal macrovesicular steatosis in a patient with poorly controlled type 1 diabetes. **Intern. Emerg. Med.**, v.3, p.273-274, 2008.
- MATSUBARA, T. et al. Respiratory activity and cytochrome content of liver mitochondria from diabetic rats. **Life Sciences**, v.10, n.24, p.1429-1440, 1971.
- MCGRATH, N.M.; YEONG, M.L. Type 1 diabetes mellitus and hepatic sinusoidal fibrosis. **Diabetic Medicine**, v.17, p.87-88, 2000.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. **Prática de Biologia Celular**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1980.
- MUNNS, C.F.J. et al. Hepatic glycogenosis: reversible hepatomegaly in type 1 diabetes. **J. Paediatr. Child Health**, v.36, p.449-452, 2000.
- PAIN, V.M. et al. Effect of diabetes on the ultrastructure of the hepatocyte and on the distribution and activity of ribosomes in the free and membrane-bound populations. **Biochim Biophys Acta**, v.353, n.4, p.487-498, 1974.
- REAVEN, E.P.; PETERSON, D.T.; REAVEN, G.M. The Effect of Experimental Diabetes Mellitus and Insulin Replacement on Hepatic Ultrastructure and Protein Synthesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.52, p.248-262, 1973.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high Ph electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of cell Biology**, p.208-212, 1963.
- ROSS, M.H.; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas**. 5ª Edição, São Paulo: Editora Panamericana, 2008.
- TOMIHIRA, M. et al. Intermittent and recurrent hepatomegaly due to glycogen storage in a patient with type 1 diabetes: genetic analysis of the liver glycogen phosphorylase gene (PYGL). **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.65, p.175-182, 2004.
- TORBENSON, M. et al. Glycogenic hepatopathy: an underrecognized hepatic complication of diabetes mellitus. **The American Journal of Surgical Pathology**, v.30, n.4, p.508-513. 2006.

- TORRES, M.; LÓPEZ, D. Liver glycogen storage associated with uncontrolled type 1 diabetes mellitus. **Journal of Hepatology**, v.35, p.538, 2001.
- VALLANCE-OWEN, J. Liver glycogen in diabetes mellitus. **J. Clin. Path.**, v.5, p.42-52, 1952.
- WHITTON, P.D.; HEMS, D.A. Glycogen Synthesis in the Perfused Liver of Streptozotocin-Diabetic Rats. **Biochem. J.**, v.150, p.153-165, 1975.



# Capítulo II

Alterações histoquímicas e ultraestruturais do intestino grosso de ratos diabéticos tipo I e os efeitos do treinamento físico.

## 2.1. RESUMO

O diabetes mellitus tipo I é conhecido como sendo causa de inúmeros distúrbios gastrointestinais, como náuseas, vômitos, diarreia e constipação. A prática regular de exercícios físicos e seus efeitos estruturais no intestino grosso, no entanto, são raramente estudados. A fim de se analisar as alterações provenientes do desenvolvimento do diabetes tipo I, e os benefícios da prática de um protocolo de treinamento físico moderado, amostras do intestino grosso foram coletadas e processadas, e em seguida analisadas por meio de técnicas histoquímicas e ultraestruturais. A análise histoquímica revelou aspectos importantes da doença. Foi detectado significativo aumento nos teores de carboidratos das mucinas secretadas pelas células caliciformes de indivíduos diabéticos, bem como diminuição na quantidade de fibras colágenas totais na submucosa e lâmina própria de tecido conjuntivo. O exercício, contudo, somente resultou em melhoras referentes ao teor de colágeno na submucosa, não promovendo alterações significativas na secreção da mucosa intestinal. Ultraestruturalmente, foram observadas algumas mudanças quanto às características gerais das células epiteliais, como modificações na estrutura das microvilosidades, junções oclusivas e interdigitações das células absortivas, e na quantidade de cisternas do complexo de Golgi das células caliciformes. A prática de exercícios resultou em benefícios no quadro patológico apresentado, principalmente na recuperação das características morfológicas das interdigitações das células absortivas, e na diminuição da quantidade de cisternas do complexo de Golgi nas células caliciformes. Sendo assim, conclui-se que o treinamento físico pode ser considerado um importante fator de auxílio no tratamento dos sintomas gastrointestinais, possivelmente melhorando as condições de motilidade intestinal.

## 2.2. INTRODUÇÃO

O intestino grosso é a porção do trato intestinal que compreende o ceco, cólon, reto e o canal anal (ROSS, PAWLINA, 2008; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008). Tem como função principal extrair água e íons do quimo, produzido no intestino delgado, e compactá-lo em fezes, para ser eliminado (GARTNER; HIAT; 2007).

O diabetes mellitus é uma doença metabólica que causa importantes complicações gastrointestinais (ÖZTÜRK; ALTAN; YILDIZOGLU-ARI, 1996), e tais desordens podem ocorrer em qualquer estágio do diabetes, em toda a extensão do intestino (FOLWACZNY et al, 1995). Mais de 50% dos pacientes diabéticos sofrem de distúrbios intestinais (FORREST; PARSONS, 2003). Sintomas como náuseas, vômitos, diarreia e constipação são bastante comuns entre pacientes diabéticos, e suas causas parecem resultar de desordens na motilidade do trato gastrointestinal (SPANGÉUS; EL-SALHY, 1998).

A superfície intestinal é um dos mais importantes componentes do sistema imune, separando agentes altamente imunogênicos no lúmen intestinal da submucosa altamente imunorreativa (VAARALA; ATKINSON; NEU, 2008). Aumento na permeabilidade intestinal, presente em indivíduos diabéticos tipo I, tem sido relatado em humanos e em modelos espontâneos da doença, encontrando-se relacionada à deficiência nas proteínas principais das junções oclusivas no intestino delgado (SECONDULFO et al, 2001; NEU et al, 2005; CATASSI, NOBILE, BIAGIONI, 2006; DESSEIN, PEYRIN-BIROULET, CHAMAILLARD, 2009). A passagem de antígenos pela via paracelular pode determinar, em indivíduos geneticamente predispostos, o aumento no risco de doenças autoimunes, incluindo o diabetes (SAPONE et al, 2003; DAMCI et al, 2003; VAARALA, ATKINSON, NEU, 2008). No entanto, de acordo com Neu et al (2005), é difícil verificar se a função reduzida na barreira intestinal precedeu a doença ou se a doença foi a causa responsável pela disfunção da barreira intestinal.

Pacientes com diabetes mellitus e constipação severa podem ter neuropatia autonômica que leva à falta de resposta gastro-colônica após a refeição (BATTLE et al,

1980). Nenhum relato na literatura, no entanto, avaliou sistematicamente todos os mecanismos putativos da diarreia crônica em qualquer grupo de pacientes com diabetes (VALDOVINOS; CAMILLERI; ZIMMERMAN, 1993). Em grande parte dos casos, o fator complicador da diarreia diabética é o crescimento bacteriano anormal no trato intestinal. Nestes, a duração da diarreia é maior, a quantidade de fezes também é mais elevada, e os sintomas gastrointestinais são frequentemente mais severos, quando comparados com pacientes sem crescimento bacteriano (VIRALLY-MONOD et al, 1998). Em outros casos, foi atribuída à neuropatia autonômica do trato intestinal a responsabilidade pela diarreia presente em indivíduos diabéticos (SPANGÉUS, EL-SALHY, 1998; BYTZER et al, 2001; SOUTHWELL, 2008). Outros estudos, contudo, consideram as alterações nas secreções intestinais como suas causas mais prováveis (VALDOVINOS; CAMILLERI; ZIMMERMAN, 1993).

### **2.3. OBJETIVOS**

O objetivo geral deste trabalho foi analisar, por meio da utilização de técnicas histoquímicas e ultraestruturais, as alterações morfológicas resultantes do desenvolvimento do diabetes mellitus tipo I no intestino grosso e, a partir deste estudo, avaliar os efeitos do treinamento físico moderado na atenuação ou prevenção destas alterações.

## 2.4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.4.1. HISTOLOGIA/HISTOQUÍMICA

Amostras do intestino grosso foram coletadas e fixadas em Bouin. As amostras retiradas do cólon corresponderam a fragmentos de uma mesma região, tendo-se em vista que o número de células caliciformes aumenta do ceco para o cólon sigmóide (GARTNER; HIAT, 2007). Desta forma, foram evitados possíveis erros de caracterização de dados como, por exemplo, a quantidade de células caliciformes e a intensidade da secreção.

Os tecidos foram incluídos em historesina Leica e cortados em Micrótomo Leica RM2145 na espessura de 6 micrômetros. Os cortes foram, então, submetidos às seguintes técnicas histoquímicas:

- Hematoxilina-Eosina (H-E) - rotina.

Os cortes foram hidratados, corados com Hematoxilina por 10 minutos, e reagiram com água por 4 minutos. Posteriormente, foram lavados e corados com Eosina, por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados e montados em bálsamo do Canadá sintético (adaptado de JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S., 1983).

- Xilidine-Ponceau - proteínas coradas em laranja.

Os cortes foram corados em Xilidine-Ponceau por 30 minutos, sendo em seguida tamponados em Acetato de Sódio (pH=2,5) a 3,5% por um minuto. Logo depois, foram lavados em água destilada e montados em bálsamo do Canadá sintético (adaptado de MELLO; VIDAL, 1980).

- Ácido Periódico de Schiff (PAS) - polissacarídeos corados em vermelho.

Os cortes reagiram por 10 minutos com solução de Ácido Periódico 0,4%. Em seguida, foram lavados em água destilada e colocados no Reativo de Schiff por 1 hora, no escuro. Posteriormente, o material foi lavado em água sulfurosa (3 minutos), água corrente (20 minutos) e montado em bálsamo do Canadá sintético (adaptado de JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S., 1983).

- PAS-Alcian Blue - polissacarídeos ácidos corados em azul.

Os cortes foram hidratados em água destilada, corados com o azul de Alcian pH 2,5 por 30 minutos, e novamente lavados em água destilada. Em seguida, reagiram com solução de Ácido Periódico 1% por 5 minutos. Após outra lavagem em água destilada, o material foi colocado no Reativo de Schiff por 30 minutos, no escuro, lavado em água sulfurosa (1 minuto), água corrente (10 minutos) e montado em bálsamo do Canadá sintético (adaptado de JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S., 1983).

- Picrosirius-Hematoxilina - fibras colágenas totais coradas em vermelho.

Os cortes foram corados na solução de Picrosirius por 60 minutos, a 60°C, lavados em água, e contra-corados com Hematoxilina por 10 minutos. Em seguida, foram lavados novamente em água, e montados com bálsamo do Canadá sintético (adaptado de JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S., 1983).

Após o tratamento do material, por meio das técnicas histoquímicas listadas, e a montagem em bálsamo do Canadá sintético, o material foi fotografado em fotomicroscópio Leica DM2000, com o auxílio do software IM50.

#### 2.4.2. ULTRAESTRUTURA

- Rotina

As amostras de intestino grosso foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2), durante 24 horas, em geladeira. Em seguida,

foram realizadas duas lavagens em tampão cacodilato de sódio, com duração de 15 minutos cada e, logo depois, foi realizada a pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) a 1%, durante duas horas. As amostras foram, então, novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio por duas vezes de 15 minutos. O material foi contrastado em solução de acetato de uranila a 1%, dissolvido em álcool 10%, por 4 horas, no escuro, sendo em seguida desidratado em uma série gradativa de álcoois (de 70 a 100%). Posteriormente, foi embebido em resina Epon-Araldite mais acetona, na proporção de 1:1, por 24 horas. O material foi, então, incluído em resina pura e levado à estufa por 72 horas, a 60°C, para polimerização.

Os blocos de resina foram cortados em ultra-micrótomo Porter Blum, e os cortes colocados em grades de cobre. Em seguida, foram contrastados em solução de acetato de uranila, durante 45 minutos, lavados em água e posteriormente contrastados em citrato de chumbo, por 15 minutos, sendo novamente lavados em água e solução de hidróxido de sódio 0,02M (adaptado de REYNOLDS, 1963).

O material foi analisado e fotografado ao microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100 do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Departamento de Biologia, UNESP - Rio Claro.

#### 2.4.3. ANÁLISE DOS RESULTADOS HISTOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS

Os dados obtidos a partir dos testes de glicemia dos indivíduos, 72 horas antes do sacrifício, resultaram em uma média glicêmica por grupo de ratos, a fim de se determinar, para cada grupo, três indivíduos representativos, que forneceram as amostras analisadas em histologia, histoquímica e ultraestrutura.

As análises dos resultados obtidos em microscopia de luz e em microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas de modo qualitativo, a partir da observação das características de cada órgão, em comparação com os indivíduos controle, tanto sedentários quanto treinados.

Os dados histoquímicos foram listados em uma tabela, na qual consta a análise da intensidade de reação de cada técnica histoquímica com os componentes específicos de cada órgão, simbolizada por sinais de +, para cada um dos três ratos escolhidos para cada grupo.

Nos animais integrantes dos grupos de análise, diferenças individuais foram observadas, tanto em histologia/histoquímica, quanto em ultraestrutura. Desta forma, para a determinação das características que representassem o perfil do grupo, cada conjunto de três



indivíduos foi analisado separadamente, comparando-se os resultados obtidos entre os respectivos animais. Em cada grupo (CS, CT, DS, DT), as diferenças individuais foram descartadas, e somente foram consideradas características representativas do perfil do grupo aquelas que foram encontradas em pelo menos dois ou mais indivíduos constituintes deste grupo. Destes indivíduos foram feitas as fotos para a análise histoquímica e ultraestrutural, e posterior elaboração da tabela e listagem dos resultados.

#### 2.4.4. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Todos os procedimentos experimentais efetuados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Uniararas, sendo conduzidos de acordo com as normas sugeridas para a experimentação animal (Processo nº633/2008).

## 2.5. RESULTADOS

### 2.5.1. HISTOLOGIA/HISTOQUÍMICA

Os resultados obtidos através da observação das micrografias de cada técnica histoquímica foram analisados, caracterizados qualitativamente, e listados na Tabela 1.

#### - Hematoxilina-Eosina (H-E)

Esta reação histoquímica foi realizada apenas para a análise das características gerais do intestino grosso (Figura 1).

Com relação à acidez citoplasmática, não foram observadas diferenças entre os grupos, tanto na região da submucosa quanto na região da mucosa. Não há sinais de vacuolização, inchaço citoplasmático ou outros tipos de alterações relevantes, referentes à forma e tamanho dos núcleos e das células. Não foi notado aumento na espessura da submucosa nos diferentes grupos.

#### - Xilidine-Ponceau

Não foram observadas diferenças relevantes quanto ao teor de proteínas, em laranja, nos diferentes grupos, tanto na região da mucosa quanto na submucosa (Figura 2).

#### - Ácido Periódico de Schiff (PAS)

Esta técnica histoquímica foi utilizada com o intuito de se observar especificamente a secreção das células caliciformes, compostas essencialmente por carboidratos, com reação de cor vermelha. Importantes diferenças quanto à intensidade de reação com esta técnica

histoquímica puderam ser observadas entre os grupos. Os indivíduos CS, quando comparados aos CT, apresentaram a mesma intensidade de reação. No entanto, os indivíduos DS demonstraram reação mais intensa, quando comparados aos indivíduos CS. Indivíduos DS e DT mostraram padrões semelhantes de reação com a técnica (Figura 3).

- Ácido Periódico de Schiff-Alcian Blue (PAS-Alcian Blue)

Esta técnica histoquímica foi utilizada para a caracterização específica de polissacarídeos ácidos (reação com cor azul), nas secreções das células caliciformes, nas quais foi possível observar diferenças importantes, porém pouco perceptíveis, entre os grupos. Os resultados obtidos foram semelhantes aos observados na técnica PAS. Os indivíduos CS e CT reagiram da mesma forma à técnica de coloração. Os indivíduos DS, contudo, quando comparados aos CS, apresentaram intensidade maior na reação das células caliciformes. Indivíduos DS e DT também não apresentaram diferenças notáveis entre si (Figura 4).

- Picrosirius-Hematoxilina

O foco da utilização desta técnica, no intestino grosso, foi a observação do teor de fibras colágenas totais, com reação em vermelho, na região da submucosa e lâmina própria de tecido conjuntivo da mucosa.

Na submucosa, não foram observadas diferenças significativas provenientes da prática de exercícios físicos em indivíduos controle. Em ambos os casos, nota-se coloração bastante forte, indicando alto teor de fibras colágenas totais. Nos indivíduos DS, contudo, pudemos observar diferenças bastante marcantes, em relação ao grupo CS: os ratos DS apresentaram intensidade de reação muito menor que os CS. Os indivíduos DT, por sua vez, quando comparados aos DS, demonstraram reação caracteristicamente mais forte (Figura 5).

No que se refere à lâmina própria de tecido conjuntivo, não se nota nenhum tipo de alteração entre os indivíduos CS e CT, bem como entre os indivíduos DS e DT. No entanto, o teor de fibras colágenas nesta região é muito menor em diabéticos do que nos controles (Figura 6).

### 2.5.2. ULTRAESTRUTURA

#### - Rotina

Com relação às células epiteliais absorptivas, não foram encontradas diferenças ultraestruturais marcantes entre os grupos no que diz respeito à forma e tamanho das células e dos núcleos. As células absorptivas de todos os grupos são alongadas, com núcleo grande, abundantes mitocôndrias e microvilosidades. Os núcleos apresentaram formato bastante regular, com pouca heterocromatina e nucléolo pouco evidente ou mesmo não visualizado, em todos os grupos de análise. No entanto, os indivíduos DS apresentaram intensidade levemente maior no contraste da heterocromatina, assim como os indivíduos DT. Não existe, contudo, diferenças entre estes grupos (Figuras 7).

Em indivíduos CS e CT não foram observadas diferenças em relação às interdigitações da membrana plasmática lateral. O que se nota é que existem notáveis dilatações no espaço intercelular das interdigitações de indivíduos DS, em comparação com CS. Estas regiões anormalmente alargadas, que tornaram mais evidente o espaço intercelular, não foram observadas em DT, indicando a amenização dos efeitos do diabetes por meio da prática de exercícios físicos (Figuras 8 e 9).

Não foram encontradas modificações nas mitocôndrias das células absorptivas dos grupos analisados. Todos os indivíduos apresentaram mitocôndrias de tamanho semelhante e forma alongada, com grande quantidade de cristas em seu interior e sem diferenças relevantes na eletrondensidade da matriz mitocondrial (Figuras 10 e 11).

No ápice destas células, foram visualizadas inúmeras vesículas, de tamanho e eletrondensidade semelhantes, e sem distinção aparente entre os grupos de indivíduos. As microvilosidades, no entanto, mostraram variações em seus aspectos. Em DS, o comprimento dos microvilos é maior que em CS. O treinamento físico, contudo, não promoveu mudanças entre os grupos, tanto controles quanto diabéticos. Não foram observadas formas aberrantes ou dilatações nestas estruturas (Figuras 12 e 13).

As junções oclusivas das células epiteliais não demonstraram alterações evidentes entre indivíduos controle, em virtude do treinamento físico. Em DS, contudo, observa-se eletrondensidade maior nestas estruturas, quando comparadas aos controles. O treinamento físico em diabéticos, por sua vez, não produziu mudanças visíveis ultraestruturalmente (Figuras 14 e 15)

As células caliciformes, bem como seus respectivos núcleos, em todos os grupos, não apresentaram distinções de forma e tamanho. Os núcleos se mostraram relativamente irregulares, com heterocromatina bastante eletrondensa e nucléolo pouco evidente.

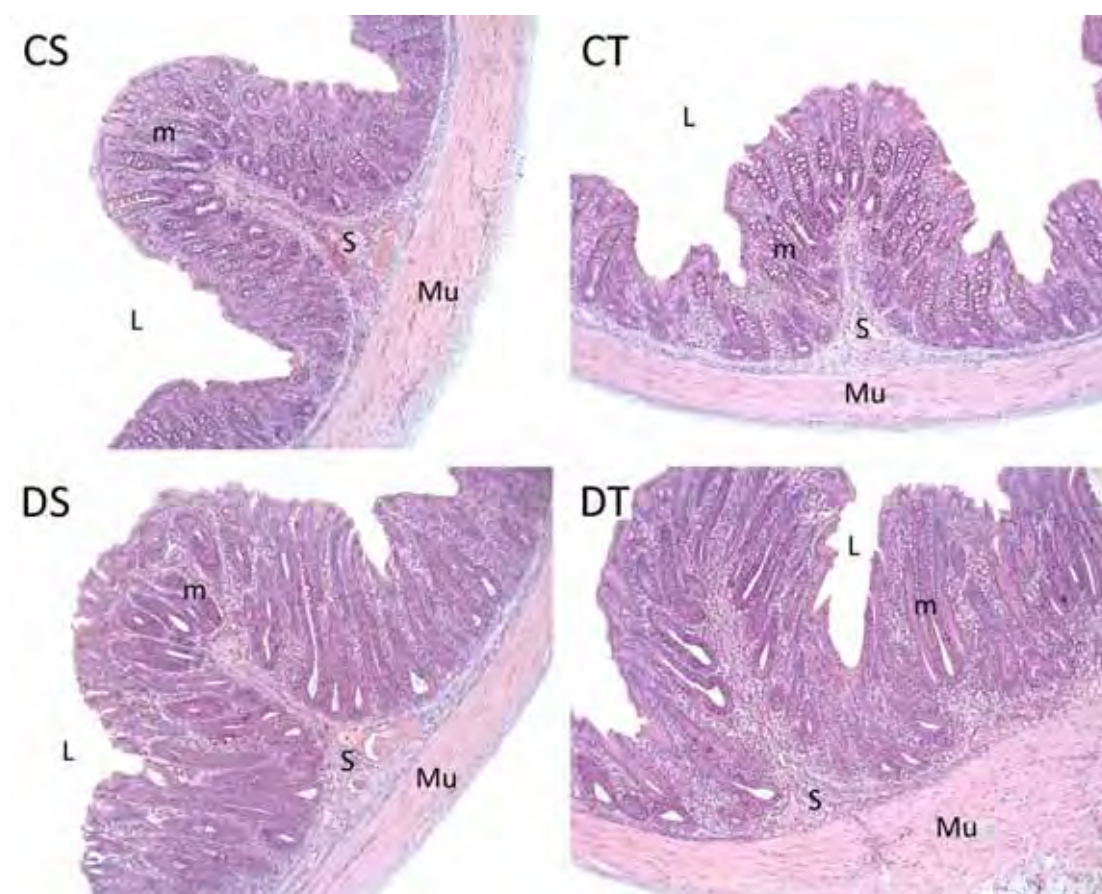
Os indivíduos DS, em comparação aos CS, demonstraram quantidade aparentemente maior de cisternas do complexo de Golgi nas células caliciformes. Em CT, as unidades dos complexos de Golgi se mostraram mais desenvolvidas, possivelmente em virtude da região do corte da célula, mais próximo do centro. Em indivíduos DT, o treinamento físico propiciou aparente diminuição na quantidade de cisternas desta organela, evidenciando os possíveis benefícios da prática de exercícios periódicos (Figuras 16 e 17). Não foram observadas diferenças nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático rugoso (RER) dos grupos avaliados. Todas as mitocôndrias apresentaram forma oval, quantidades semelhantes de cristas e mesma eletrondensidade na matriz mitocondrial (Figuras 18).

## 2.5.3. TABELA E FIGURAS

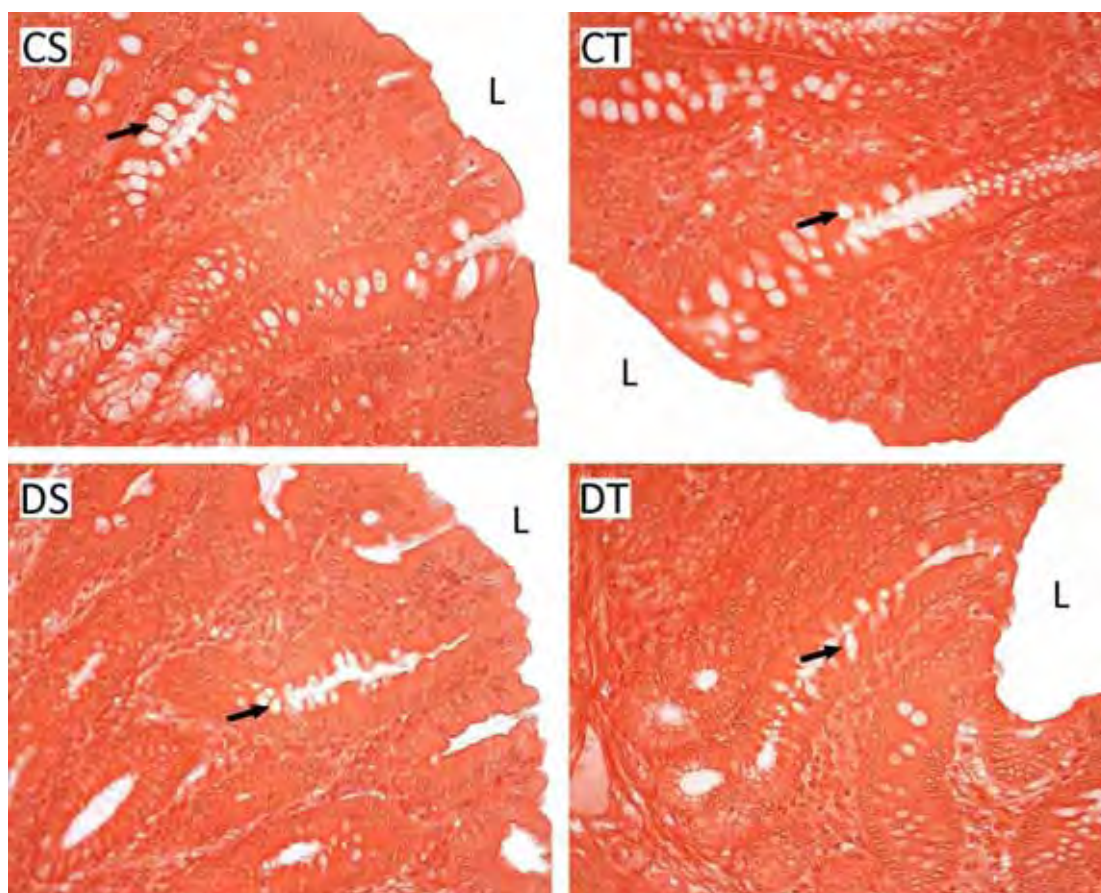
**Tabela 1** - Caracterização qualitativa dos resultados obtidos no intestino grosso.

<b>Análise histoquímica do intestino grosso</b>					
Técnica Histoquímica	Rato	Grupos			
		Controle Sedentário	Controle Treinado	Diabético Sedentário	Diabético Treinado
PAS	1	++	++	++++	++++
	2	+++	+++	+++	+++
	3	+++	+++	++++	++++
PAS-Alcian Blue	1	+++	+++	++++	++
	2	++++	+++	++++	++++
	3	+++	++++	+++	++++
Picrosirius-Hematoxilina	1	+++	++	+	++
	2	++++	++++	+	++
	3	++++	++++	+++	+
Xilidine-Ponceau	1	++++	++++	++++	++++
	2	++++	++++	++++	++++
	3	++++	++++	++++	++++

**Legenda:** (+) Reação fraca com a técnica de coloração; (++) Reação moderada; (+++) Reação forte; (++++) Reação intensa; (-) A estrutura não reagiu com a técnica utilizada.

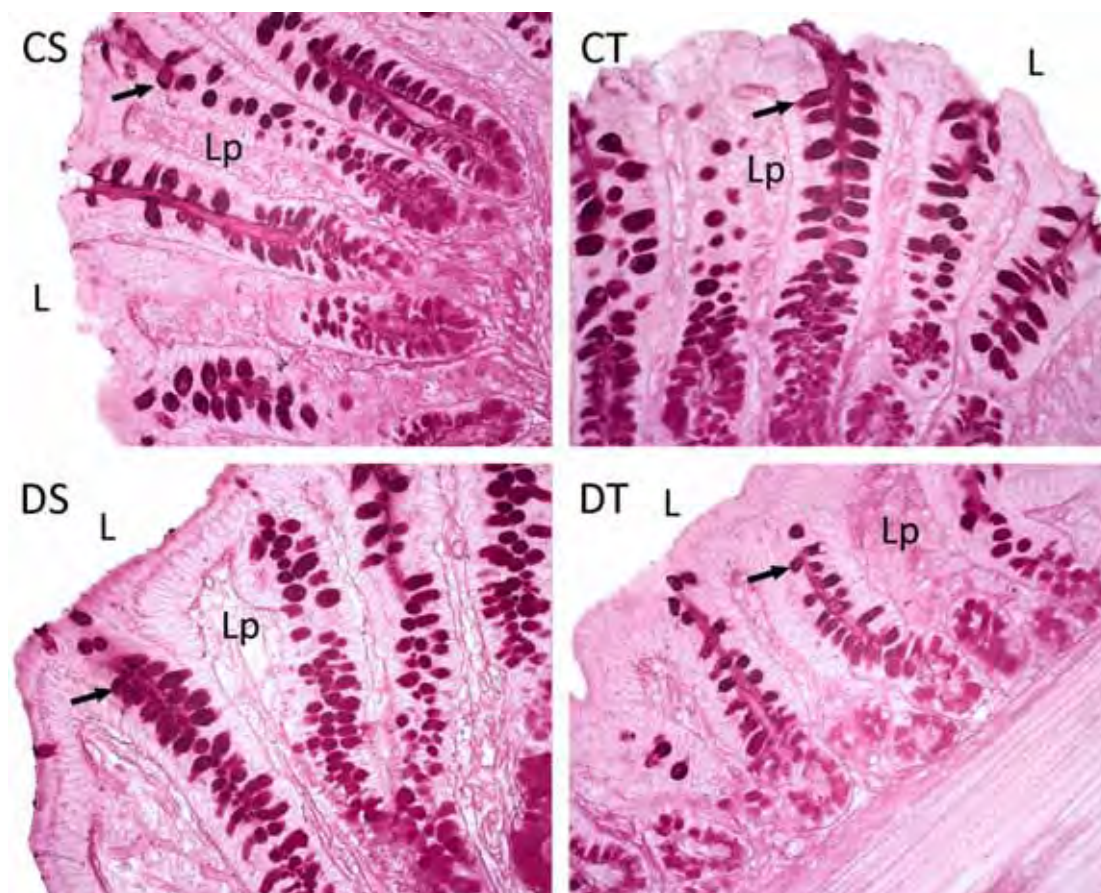


**Figura 1.** Visão geral do intestino grosso nos diferentes grupos analisados, corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina. Mu = Musculatura; S = Submucosa; m = Mucosa; L = Lúmen. Aumento: 100x.

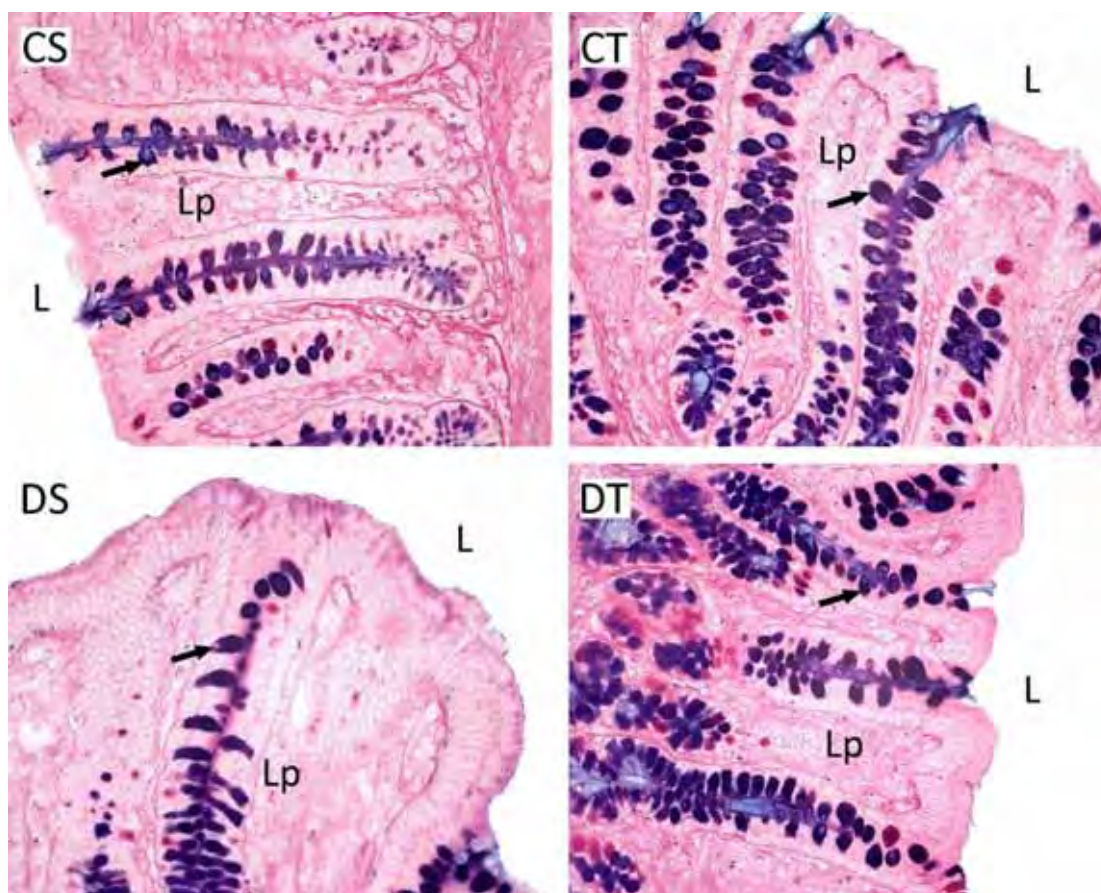


**Figura 2.** Xilidine-Ponceau, que demonstra o teor de proteínas nos tecidos. Os grupos não apresentaram diferenças relevantes. As setas indicam as células caliciformes. L = Lúmen. Aumento: 400x.



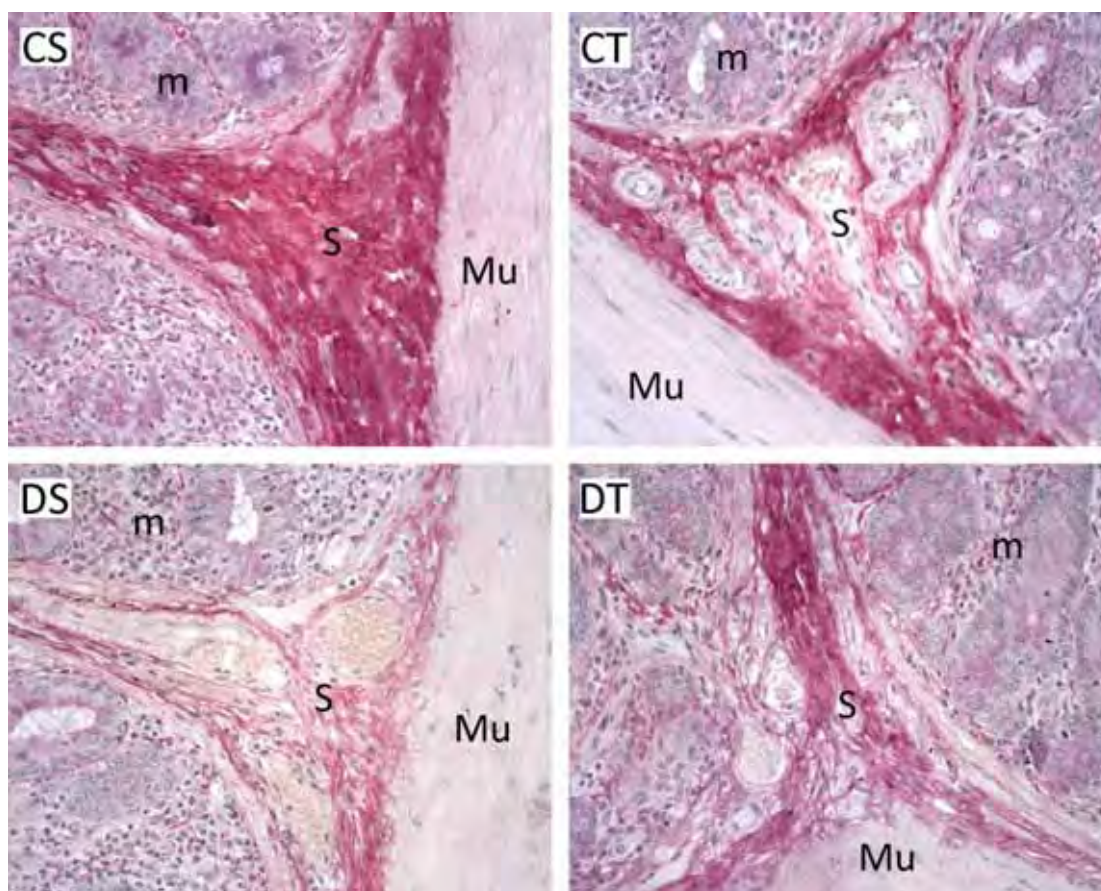


**Figura 3.** Técnica de PAS, evidenciando as secreções das células caliciformes (setas), coradas em vermelho. Notar leve diferença de intensidade entre os indivíduos controle e diabéticos. Em DS e DT, a coloração apresenta-se levemente mais forte que em CS e CT. O exercício físico não proporcionou mudanças evidentes. L = Lúmen; Lp = Lâmina Própria. Aumento: 400x.

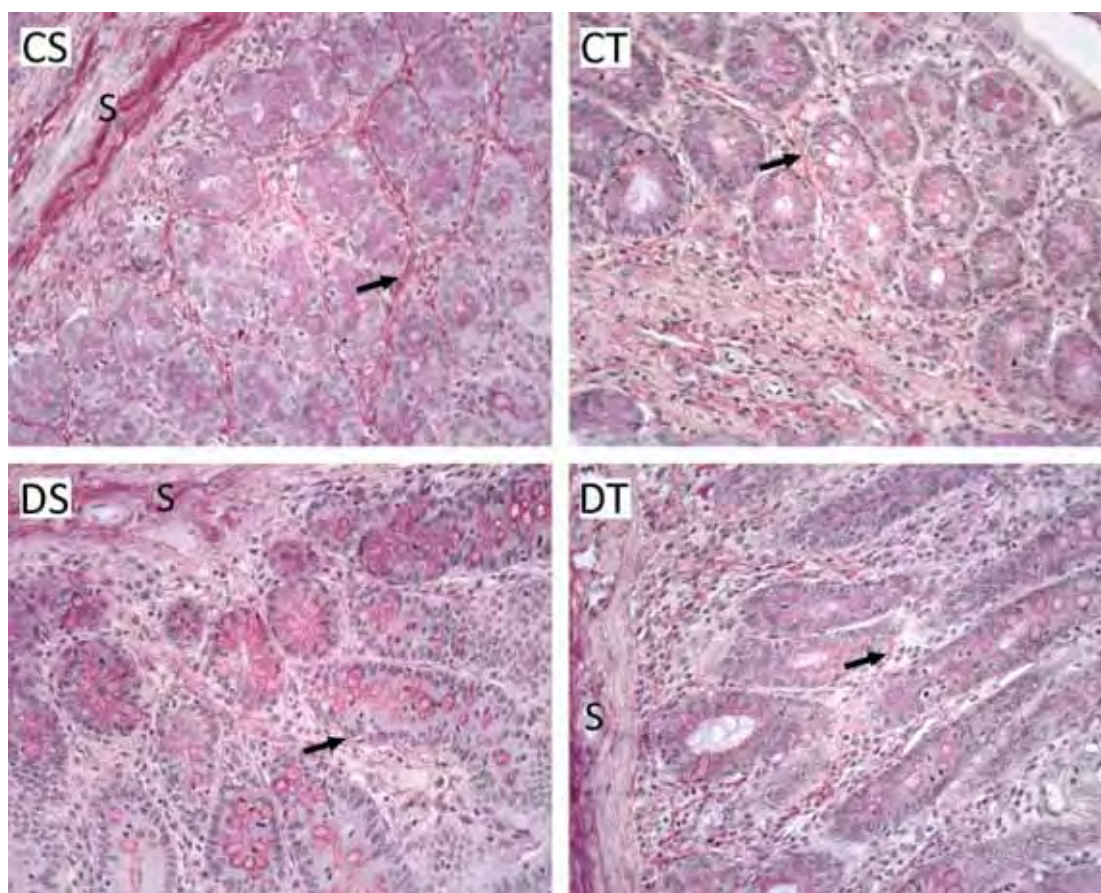


**Figura 4.** Região da mucosa intestinal, com células caliciformes coradas em azul pela técnica simultânea PAS-Alcian Blue (setas), que determina diferentes níveis de acidez de carboidratos. Notar coloração levemente mais intensa nos indivíduos diabéticos, em relação aos controles. O exercício não permitiu a observação de mudanças significativas. L = Lúmen; Lp = Lâmina Própria. Aumento: 400x.

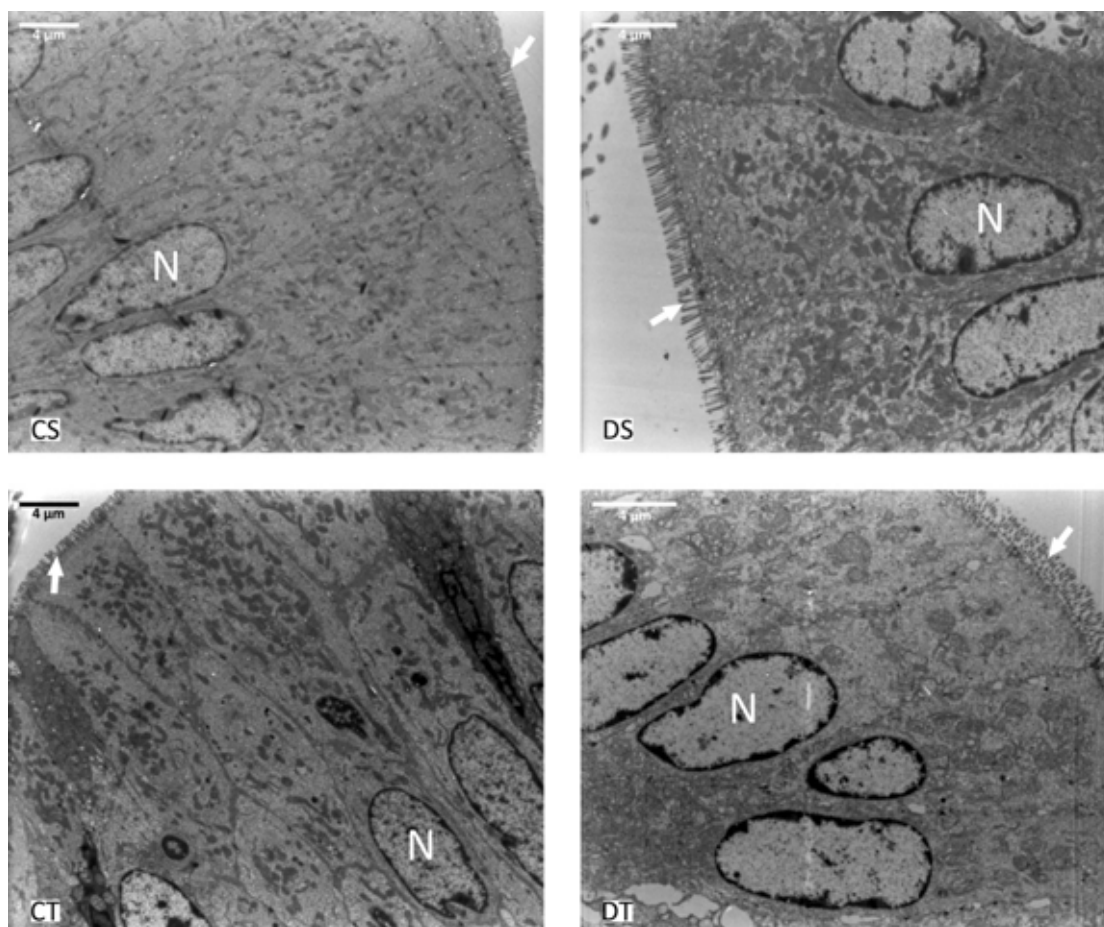




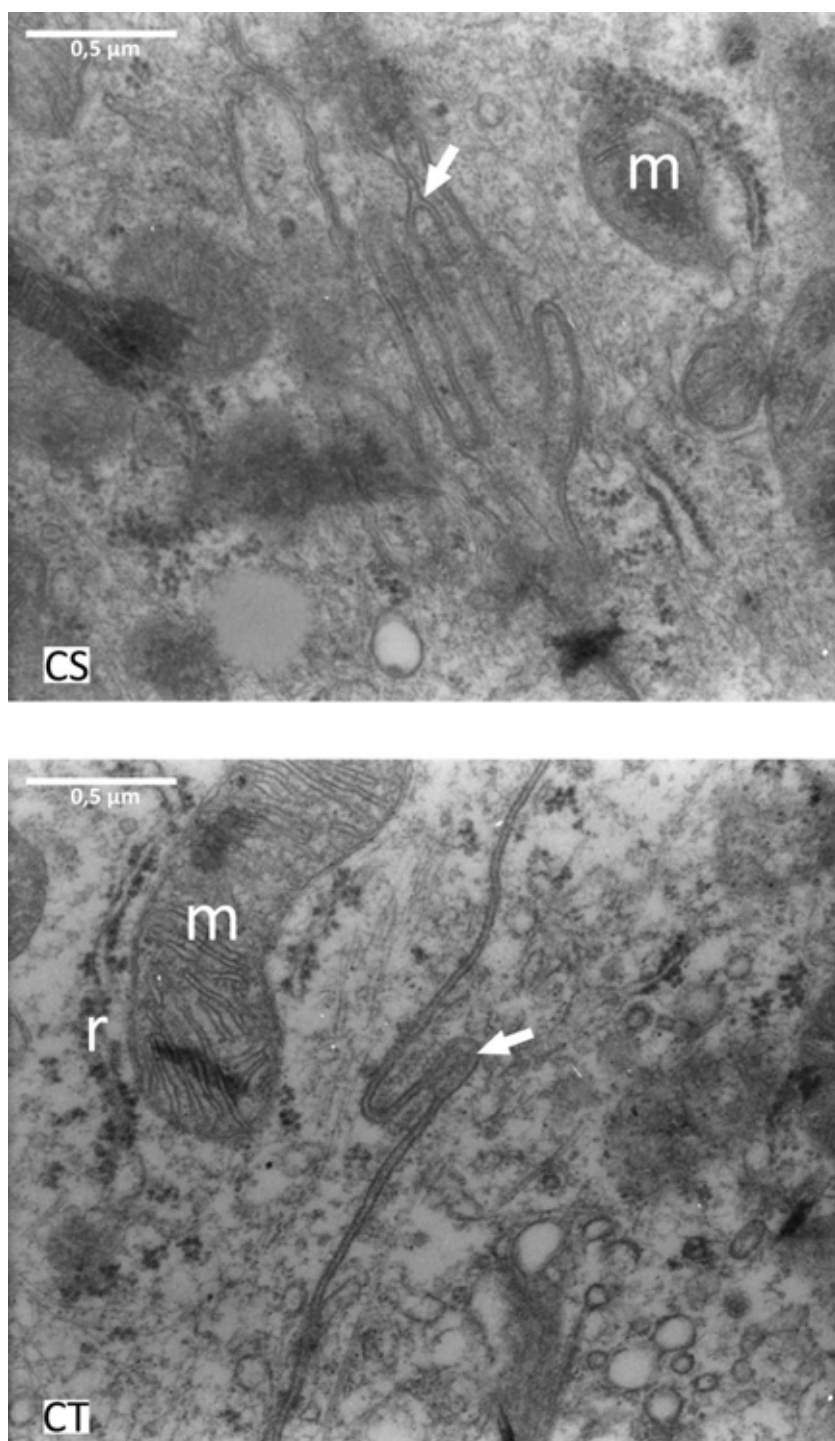
**Figura 5.** Micrografias da submucosa intestinal (S) dos diferentes grupos, coradas por Picrosirius-Hematoxilina, evidenciando fibras colágenas totais em vermelho. É possível observar intensidade muito maior de reação em indivíduos CS e CT, com relação aos DS. O treinamento físico, em DT, propiciou aumento no teor de colágenos na submucosa, evidenciado pela reação mais forte com a técnica. Mu = Musculatura; m = Mucosa. Aumento: 400x.



**Figura 6.** Técnica de Picrosirius-Hematoxilina, que reage com fibras colágenas totais da lâmina própria (setas), coradas em vermelho, ao redor das criptas intestinais. Notar a intensidade maior de coloração em indivíduos CS e CT, em relação à DS e DT. O exercício físico, contudo, praticamente não alterou a morfologia de indivíduos sedentários. S = Submucosa. Aumento: 400x.

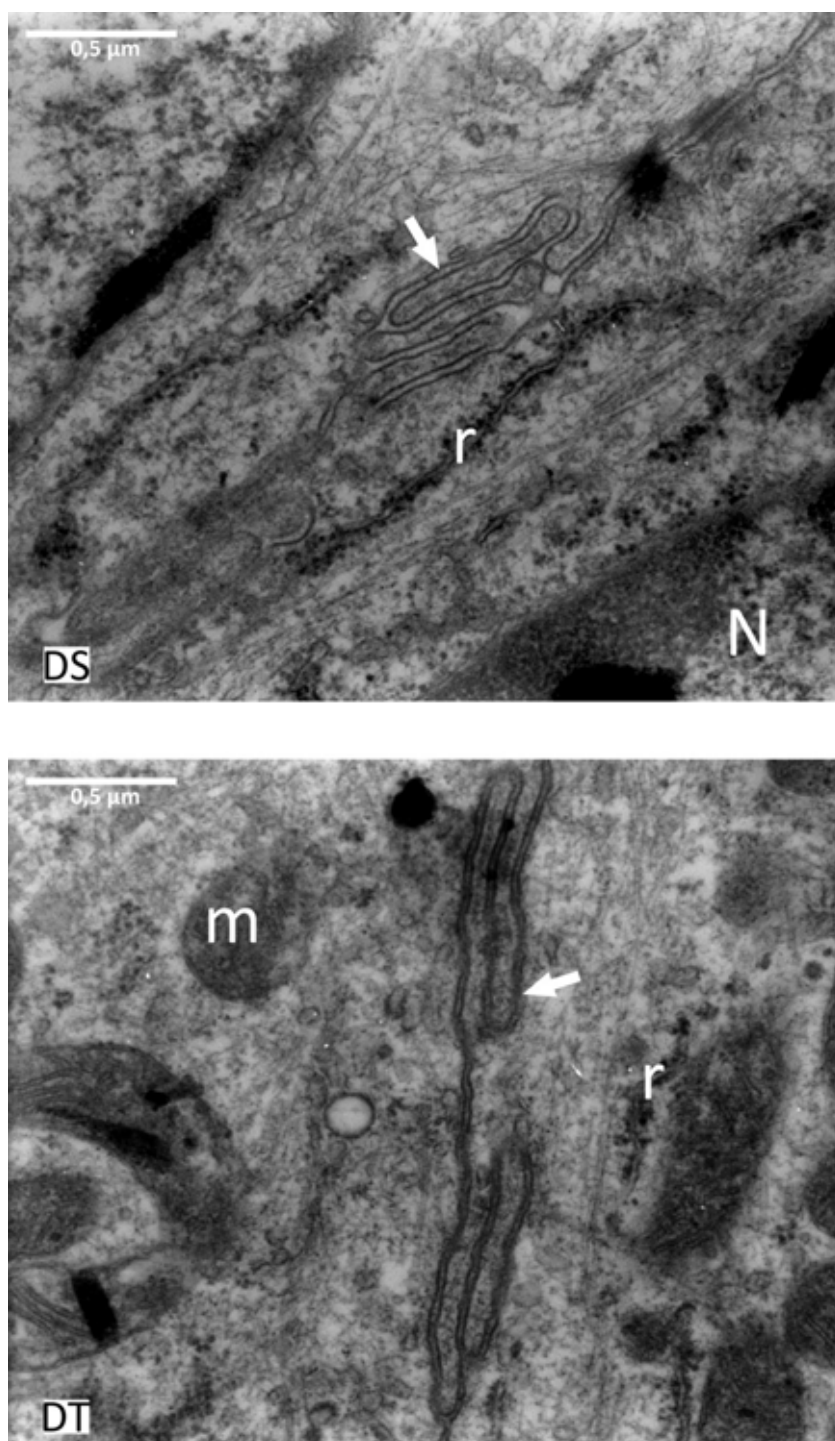


**Figura 7.** Aspecto geral das células epiteliais absorptivas do intestino grosso de indivíduos controle sedentários (CS) e treinados (CT) e diabéticos sedentários (DS) e treinados (DT). O treinamento físico não promoveu mudanças significativas na forma e tamanho das células e dos núcleos, e nas características das organelas, entre os grupos avaliados. Notar a maior intensidade de contrastação da heterocromatina, em indivíduos diabéticos, quando comparados aos controles. N = Núcleo; Seta = Microvilosidades. Barra: 4μm. Aumento: (CS e CT) 2150x; (DS e DT) 3050x.

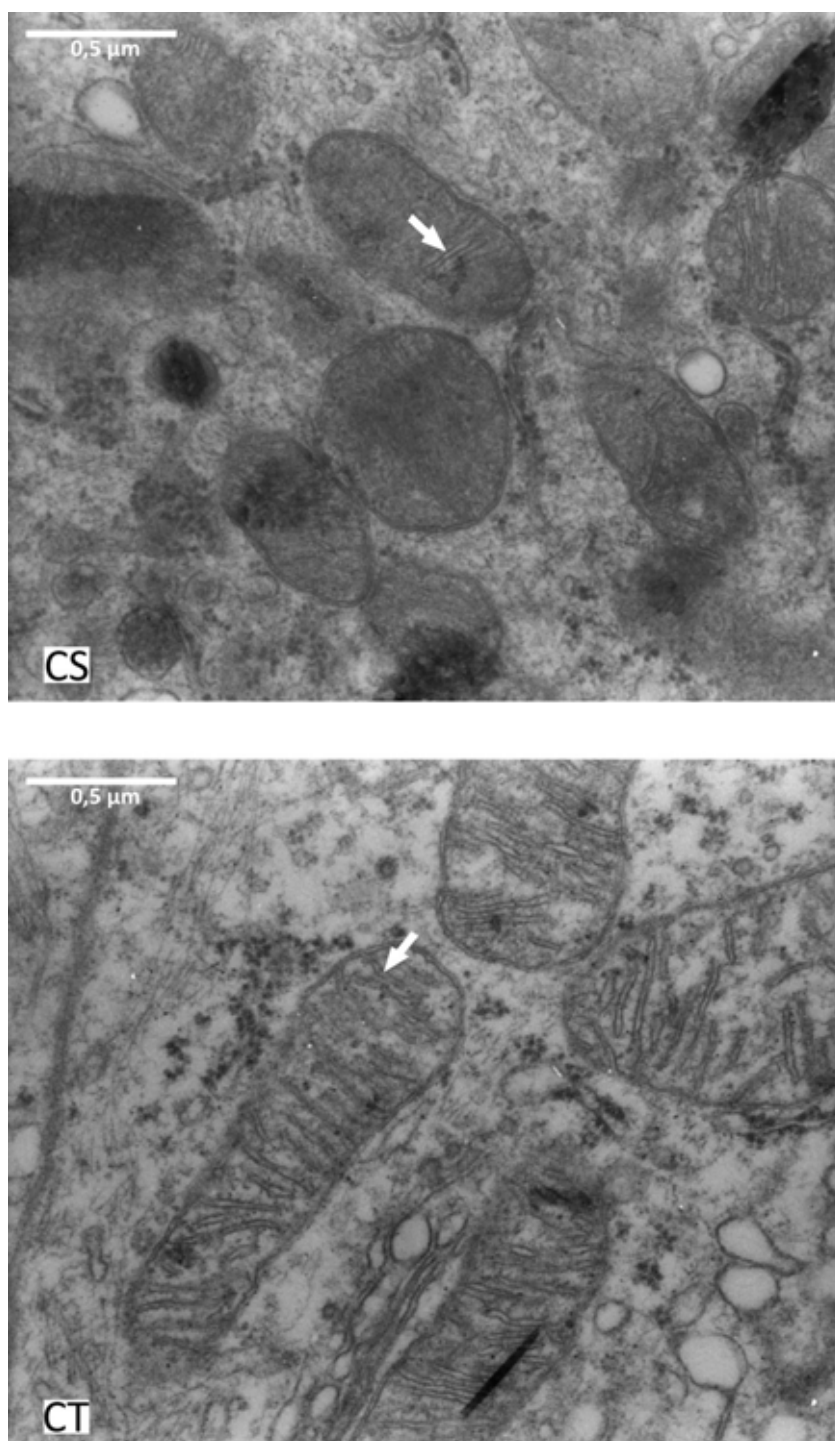


**Figura 8.** Detalhe das interdigitações da membrana plasmática lateral (setas) das células absorptivas, em indivíduos controle, sedentários (CS) e treinados (CT). O treinamento físico não promoveu mudanças entre estes grupos. r = Retículo Endoplasmático Rugoso; m = Mitocôndria. Barra: 0,5μm. Aumento: 43600x.



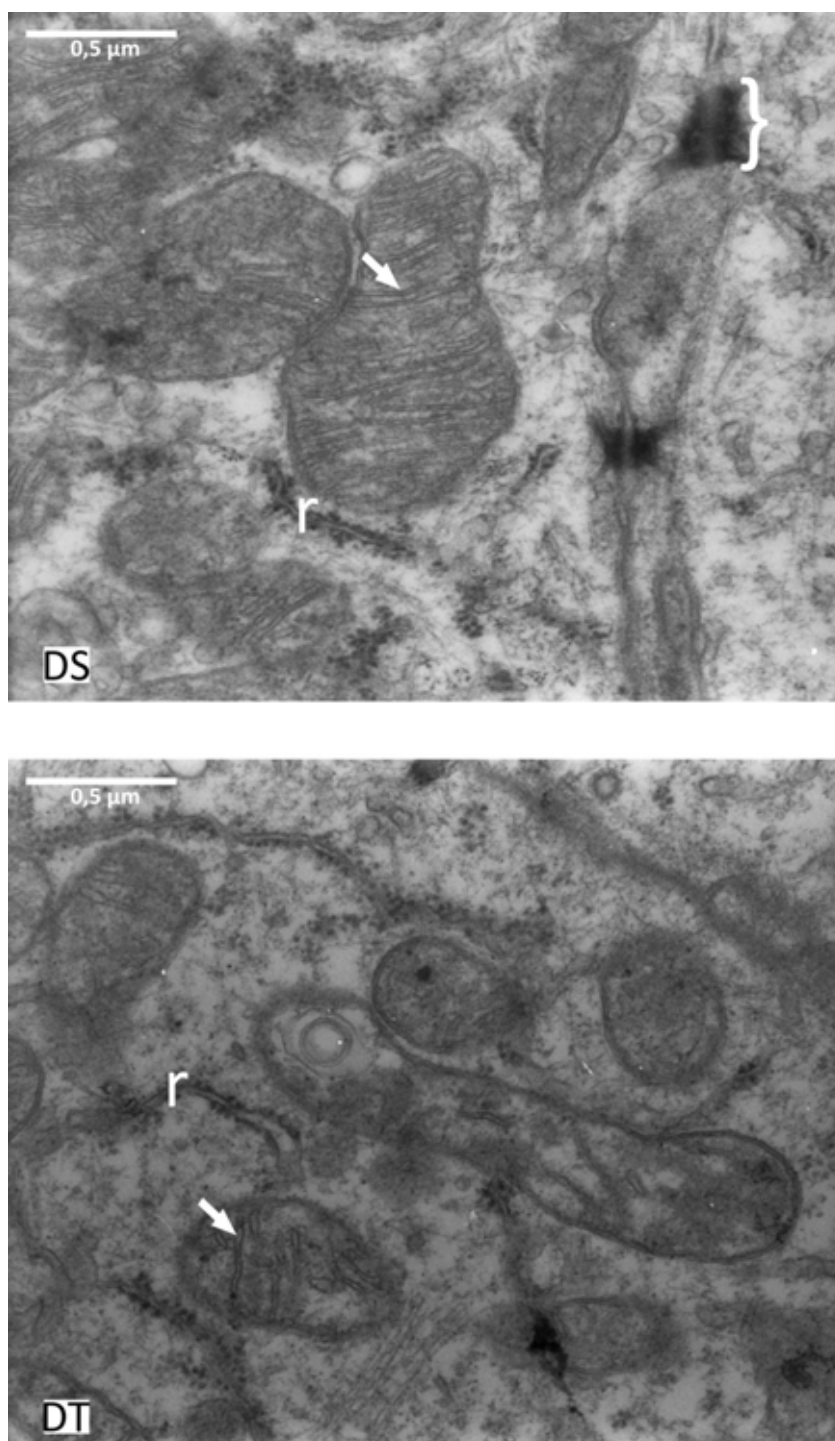


**Figura 9.** Detalhe das interdigitações da membrana plasmática lateral (setas) das células absorptivas de indivíduos diabéticos, sedentários (DS) e treinados (DT). Notar as dilatações características em ratos DS, amenizadas por meio da prática de exercícios físicos periódicos. N = Núcleo; r = Retículo Endoplasmático Rugoso; m = Mitocôndria. Barra: 0,5μm. Aumento: 43600x.

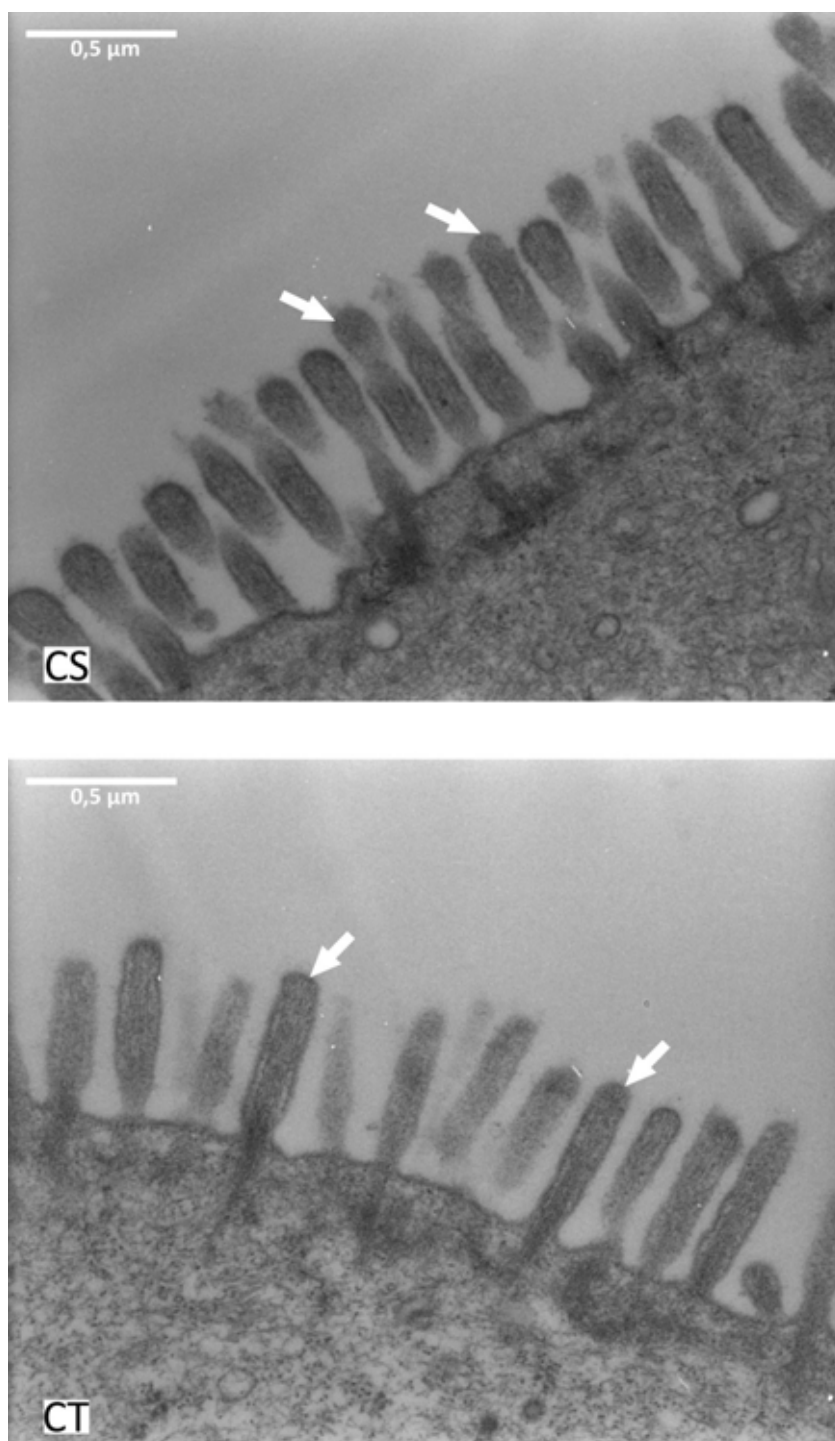


**Figura 10.** Detalhe das mitocôndrias das células absorptivas de indivíduos controle, sedentários (CS) e treinados (CT). As setas apontam as cristas mitocondriais. Notar que não existem diferenças entre os grupos quanto à quantidade de cristas e eletrondensidade da matriz. Barra: 0,5μm. Aumento: 43600x.

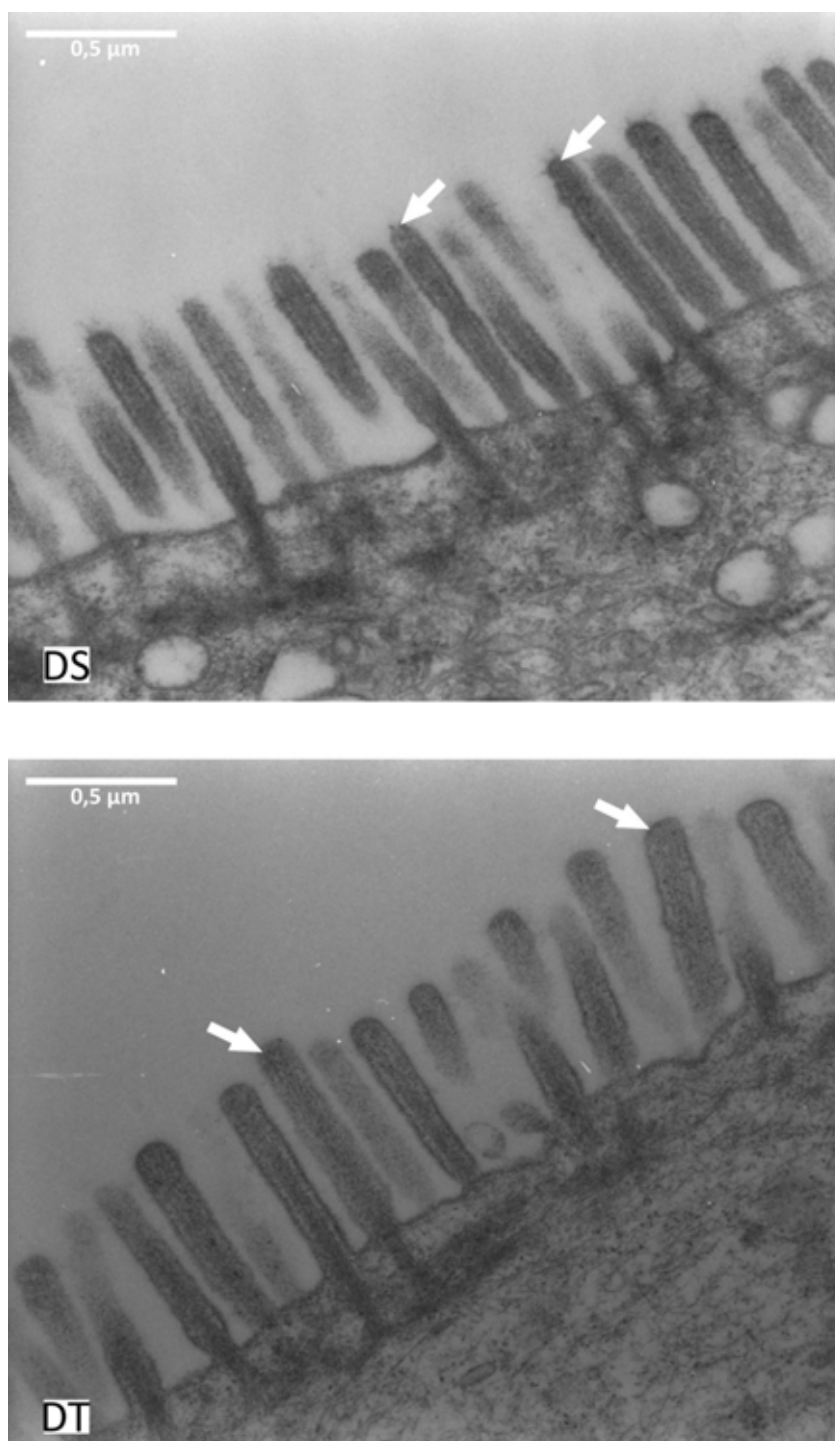




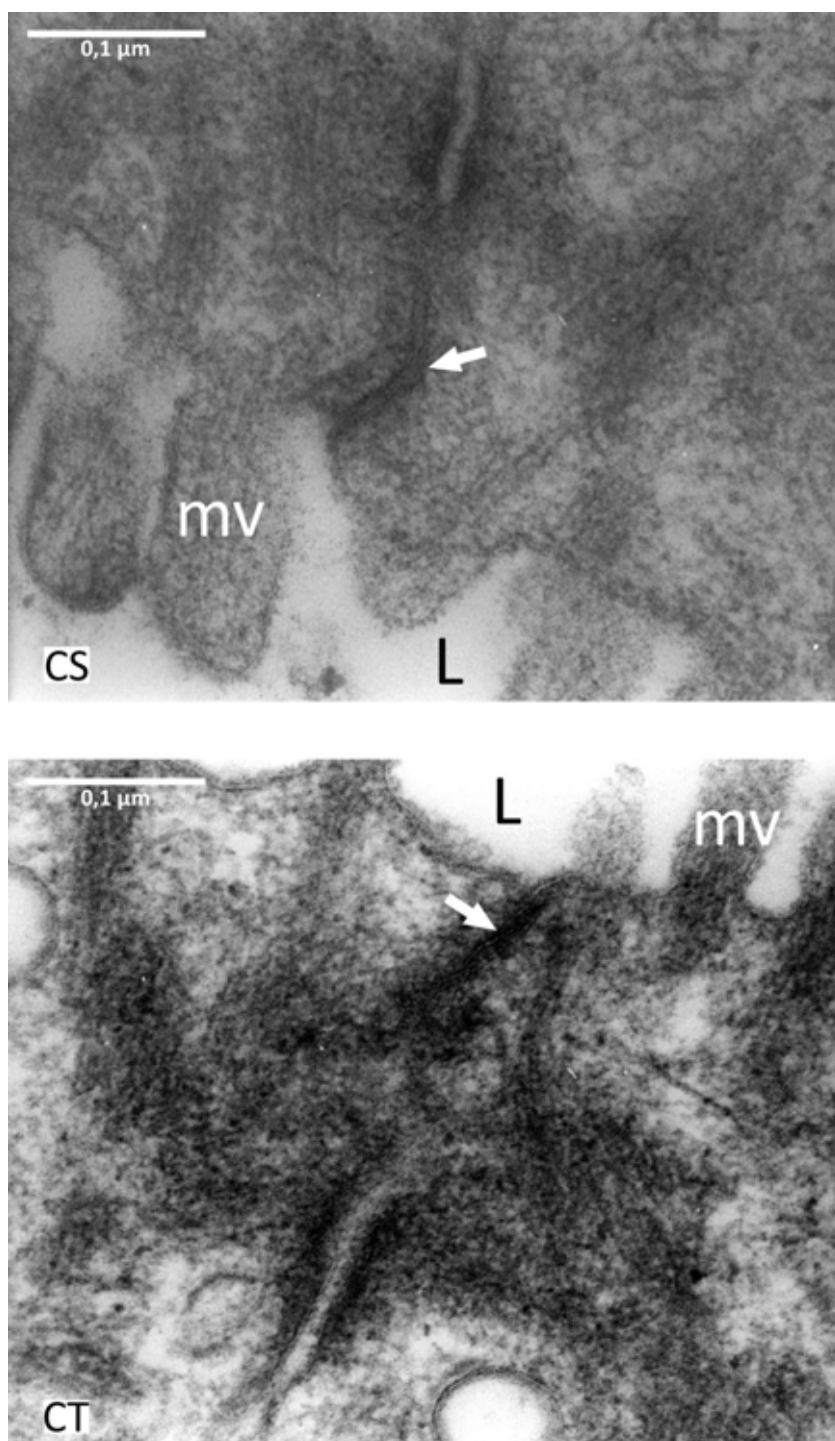
**Figura 11.** Detalhe das mitocôndrias das células absorptivas de indivíduos diabéticos, sedentários (DS) e treinados (DT). Não existem diferenças entre os grupos. r = Retículo Endoplasmático Rugoso; Chave = Desmossomo; Seta = Cristas Mitocondriais. Barra: 0,5μm. Aumento: 43600x.



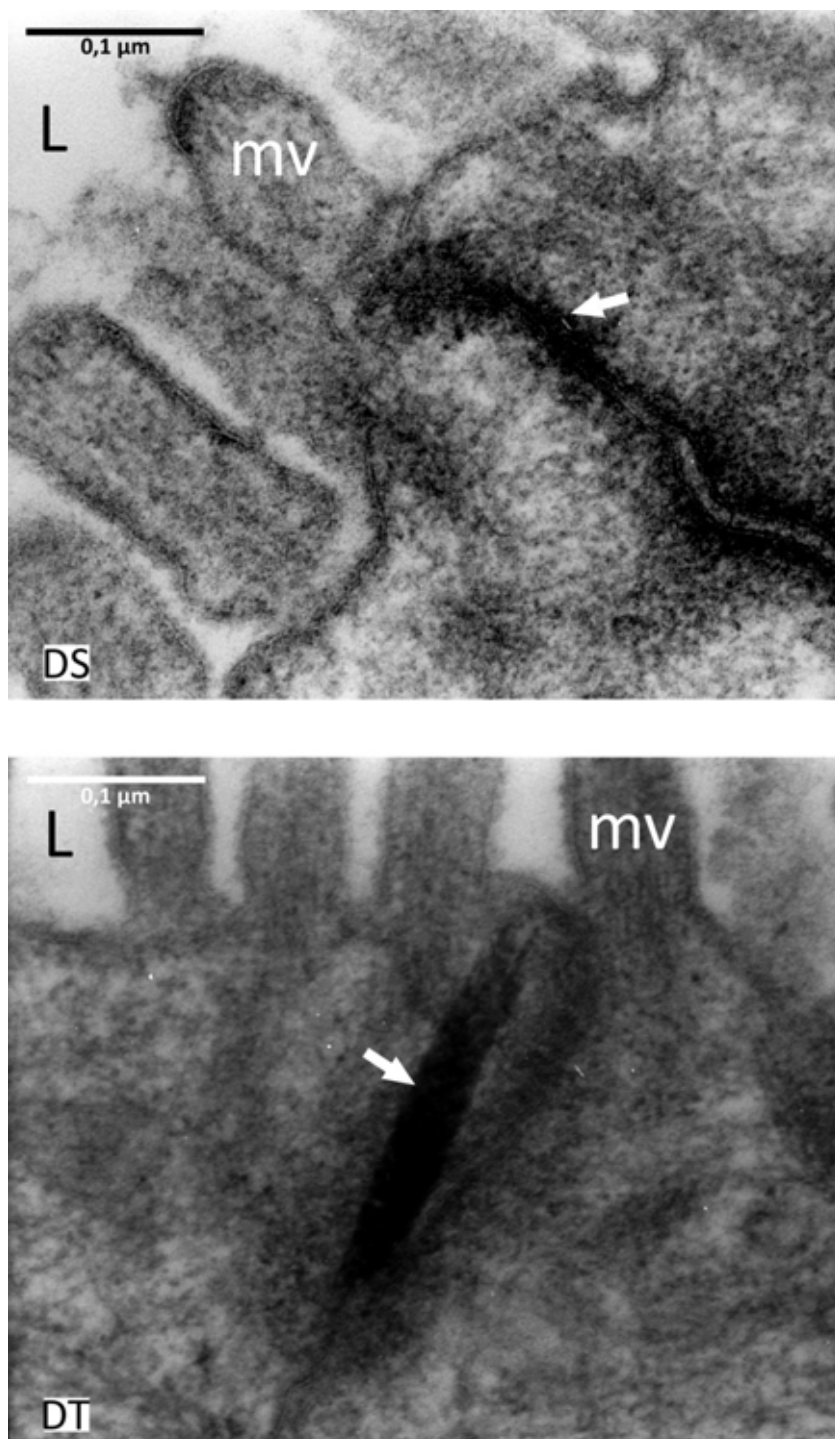
**Figura 12.** Microvilosidades (setas) no ápice das células absortivas de indivíduos controle, sedentários (CS) e treinados (CT). O treinamento físico não resultou em alterações nestas células. Barra: 0,5 $\mu\text{m}$ . Aumento: 43600x.



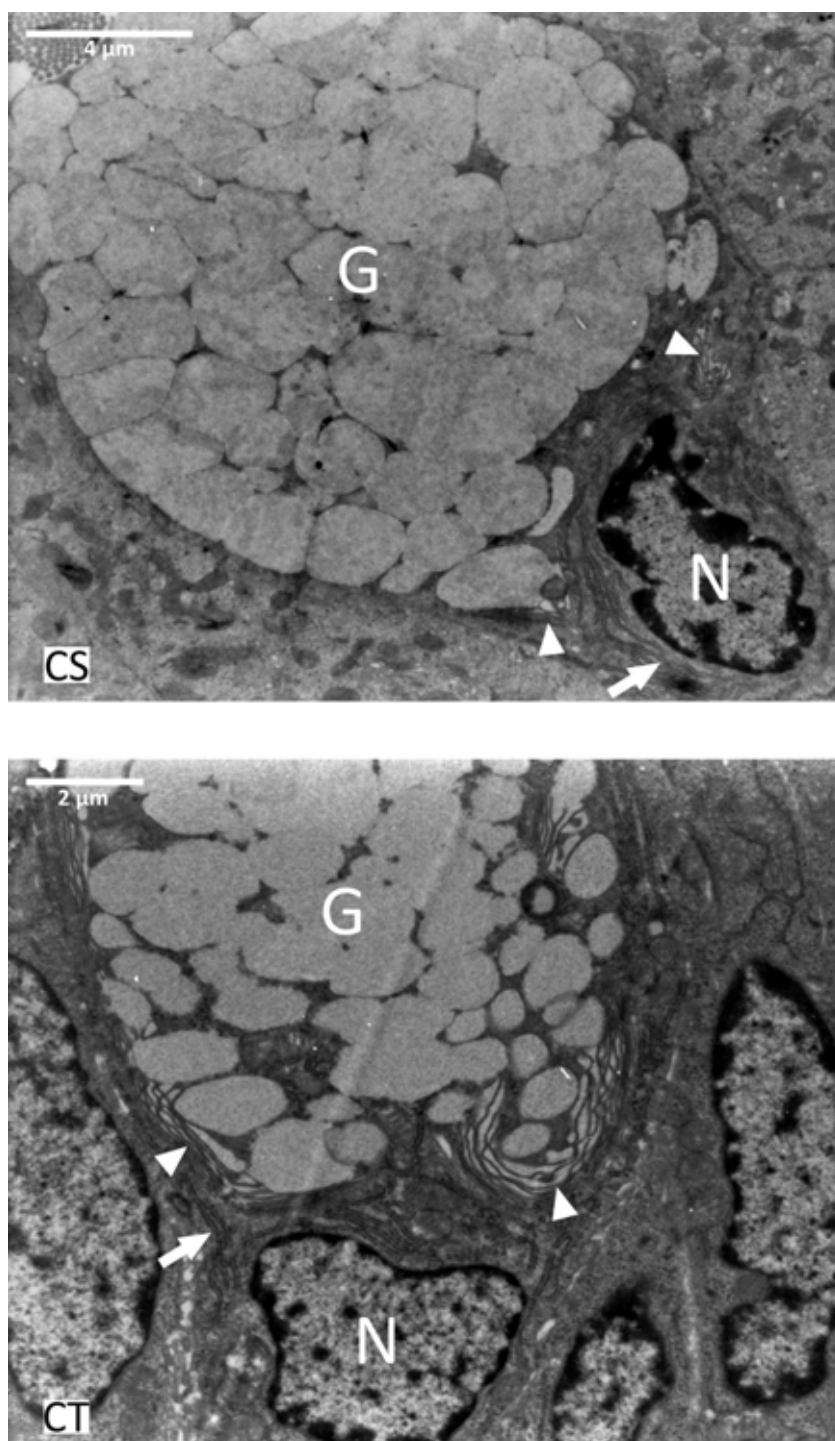
**Figura 13.** Microvilosidades (setas) das células absortivas dos indivíduos diabéticos, sedentários (DS) e treinados (DT). Observar que estas estruturas apresentam comprimento aparentemente maior do que em indivíduos controle. Não existem diferenças provenientes do treinamento físico. Barra: 0,5 $\mu\text{m}$ . Aumento: 43600x.



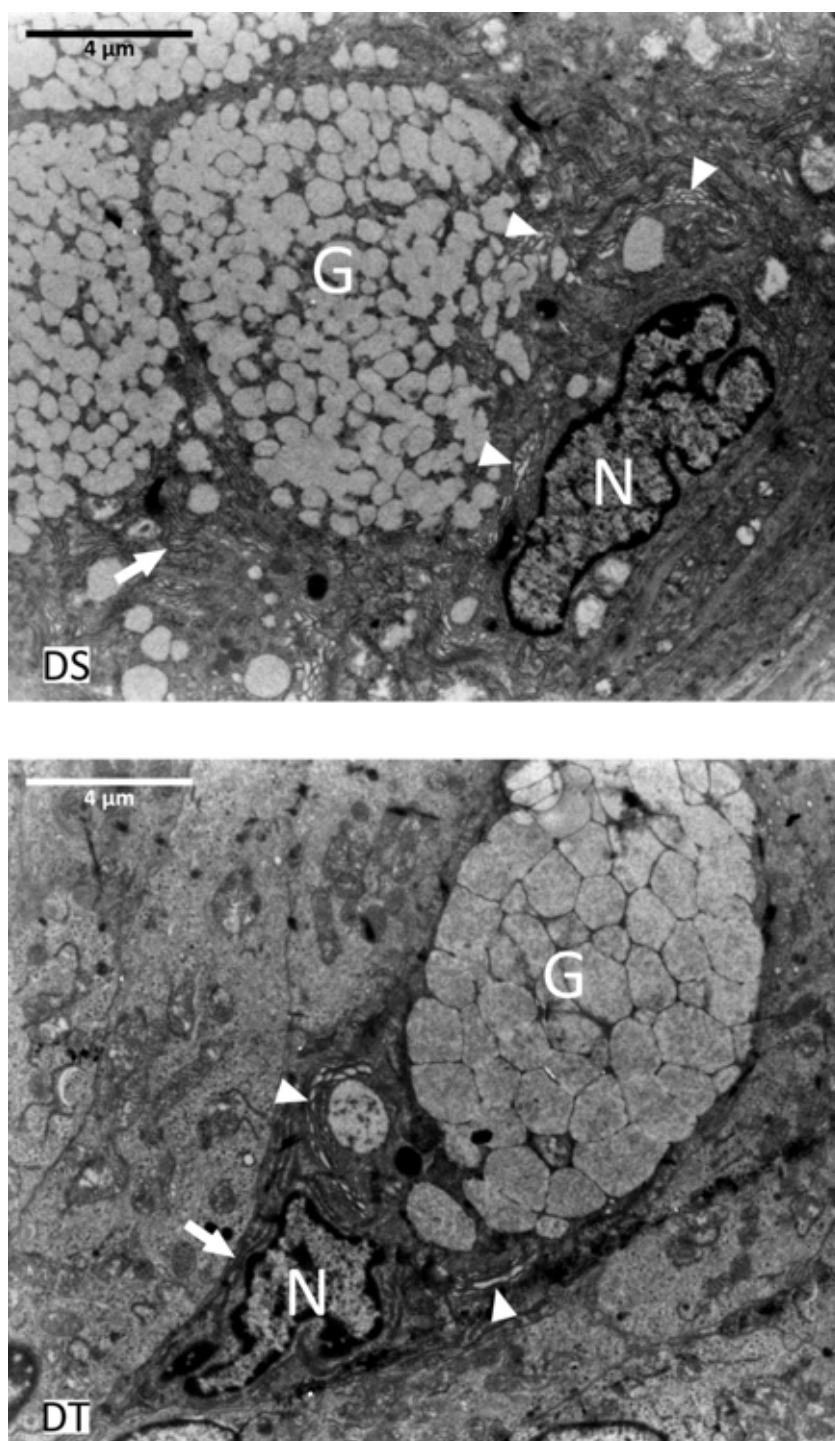
**Figura 14.** Junções oclusivas (setas) no ápice das células absortivas de indivíduos controle, sedentários (CS) e treinados (CT). Não foram observadas diferenças significativas entre estes grupos. L = Lúmen; mv = Microvilosidade. Barra: 0,1μm. Aumento: 128800x.



**Figura 15.** Junções oclusivas (setas) das células epiteliais absortivas de indivíduos diabéticos, sedentários (DS) e treinados (DT). Notar contrastação mais intensa, quando comparados aos indivíduos controle. O exercício físico não promoveu alterações entre os grupos. L= Lúmen; mv = Microvilosidade. Barra: 0,1µm. Aumento: 128800x.

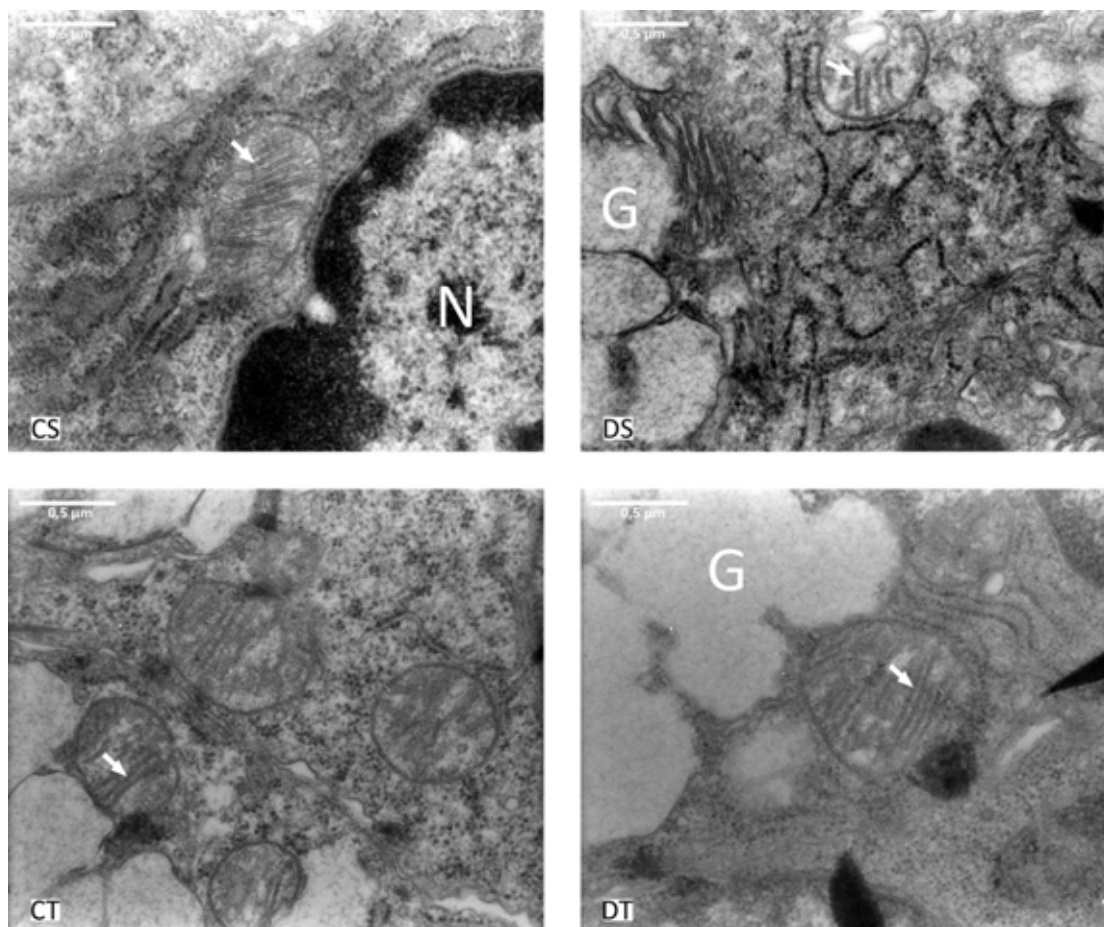


**Figura 16.** Aspecto geral das células caliciformes do intestino grosso de indivíduos controle, sedentários (CS) e treinados (CT). Não foram observadas diferenças significativas, originadas a partir da prática de exercícios físicos, no tamanho e forma das células e dos núcleos, e em organelas, como o complexo de Golgi (cabeças de setas) e Retículo Endoplasmático Rugoso (setas). N = Núcleo; G = Grânulos de Secreção. Barras: (CS) 4μm; (CT) 2 μm. Aumentos: (CS) 6000x; (CT) 8500x.



**Figura 17.** Aspecto geral das células caliciformes do intestino grosso de indivíduos diabéticos, sedentários (DS) e treinados (DT). Notar a maior quantidade de cisternas do complexo de Golgi (cabeças de setas) em DS, quando comparados aos controles. O treinamento físico, por sua vez, permitiu aparente diminuição na quantidade de unidades destas organelas, em DT. N = Núcleo; G = Grânulos de Secreção; Seta: Retículo Endoplasmático Rugoso. Barra: 4μm. Aumento: 6000x.





**Figura 18.** Ultraestrutura das mitocôndrias das células caliciformes do intestino grosso de indivíduos controle sedentários (CS) e treinados (CT), e diabéticos sedentários (DS) e treinados (DT). Não foram observadas diferenças entre os grupos analisados. N = Núcleo; Seta = Cristas Mitocondriais; G = Grânulos de Secreção. Barra: 0,5μm. Aumento: 28000x.



## 2.6. DISCUSSÃO

O diabetes mellitus tipo I é bastante conhecido como sendo causa de inúmeros distúrbios gastrointestinais (ÖZTÜRK, ALTAN, YILDIZOGLU-ARI, 1996; NAKAHARA et al, 2002), mas sua patogênese ainda não está totalmente clara (CATASSI; NOBILE; BIAGIONI, 2006). Sintomas gastrointestinais crônicos em associação com diabetes mellitus foram relatados pela primeira vez por Rundles em 1945 (VIRALLY-MONOD et al, 1998). No cólon de ratos induzidos por estreptozotocina, o diabetes gerou aumentos pronunciados em seu peso por comprimento, espessura da parede e na secção transversal da parede. Histologicamente, a espessura de todas as camadas foi aumentada, especialmente na camada mucosa, além de ocorrer rigidez na parede do intestino grosso. Estes fatores podem ter contribuído para as disfunções características do cólon e dores abdominais em pacientes diabéticos (ZHAO; NAKAGUCHI; GREGERSEN, 2009).

A análise dos grupos a partir da técnica H-E não demonstrou diferenças relevantes entre eles. Aspectos como tamanho e forma celular e nuclear, vacuolização citoplasmática e inchaço citoplasmático não foram observados.

De acordo com a literatura, elevações na profundidade das criptas foram observadas no intestino delgado, levando a alterações em sua área superficial, que tornaram mais eficiente a absorção de nutrientes, sugerindo que a indução do diabetes pode contribuir com mudanças na morfologia intestinal (MCANUFF et al, 2003). Entretanto, nós não observamos alterações morfológicas realmente significativas entre os grupos, no que diz respeito à estrutura das camadas intestinais e à profundidade das criptas. Técnicas de morfometria se mostram necessárias, portanto, para a detecção de variações no tamanho da mucosa, profundidade das criptas e espessura da submucosa.

Em um estudo realizado (SECONDULFO et al, 2001), a análise histológica do intestino de indivíduos diabéticos não mostrou alterações importantes, como sinais de atrofia ou inflamação. No entanto, quando observadas pela microscopia eletrônica, a maioria das

amostras apresentou modificações morfológicas relevantes. Estes dados, contudo, não encontraram suporte neste trabalho.

As células epiteliais do intestino apresentam função extremamente importante na absorção de água e nutrientes, além de realizar a transdução de sinais inflamatórios dos microrganismos luminais, funcionando como uma barreira e evitando a entrada de antígenos externos por meio da presença de interdigitações e junções oclusivas (VAARALA; ATKINSON; NEU, 2008). No intestino grosso, a absorção de água, característica deste órgão, ocorre nas células epiteliais absortivas. Elas são capazes de adaptar sua estrutura e função em resposta a mudanças no conteúdo intraluminal de nutrientes (MCANUFF et al, 2003).

A análise ultraestrutural das células absortivas do intestino grosso, no presente estudo, revelou algumas alterações importantes, resultantes do desenvolvimento da doença. Não foram observadas, contudo, mudanças na morfologia das células. Aspectos como forma e tamanho celular e nuclear não sofreram modificações, nem em virtude do diabetes, nem da execução do protocolo de exercícios físicos. No entanto, foram constatadas alterações nos núcleos das células absortivas dos grupos diabéticos, que apresentaram heterocromatina mais intensamente contrastada. Isso indica maior quantidade de DNA na forma condensada, evidenciando menor atividade metabólica nestas células, principalmente com relação à síntese de compostos protéicos.

Não foram observadas diferenças estruturais nas mitocôndrias, entre os grupos avaliados. Todas apresentaram morfologia semelhante, com grande quantidade de cristas e eletrondensidade semelhante da matriz mitocondrial. Também não foi observado aumento ou diminuição na quantidade destas organelas, não sendo possível, portanto, inferir acerca de modificações nas taxas de síntese de energia, que poderiam indicar alterações na absorção de água pelo cólon e fornecer evidências para as possíveis causas da diarreia diabética.

Desorganização das junções de oclusão, perda parcial de microvilosidades ou mesmo microvilosidades com estrutura completamente aberrante, e vacuolização levemente extensa do citoplasma foram observadas nas células epiteliais do intestino delgado em pacientes diabéticos (SECONDULFO et al, 2001). Além disso, alterações como, por exemplo, a presença de espaços intercelulares anormalmente alargados, com abundantes interdigitações citoplasmáticas, citoplasma rico em vacúolos, quantidades aumentadas de lisossomos e mitocôndrias na mucosa entérica, além de alterações nas microvilosidades, também foram relatadas por Secondulfo et al (2004).

Estas características, no entanto, não foram aqui observadas. No ápice das células epiteliais absortivas, algumas alterações foram detectadas, concordando em partes com os

relatos descritos por Secondulfo et al (2001 e 2004). As microvilosidades de indivíduos diabéticos, tanto sedentários quanto treinados, se mostraram mais alongadas do que em indivíduos controle. Pode-se supor, a partir destes resultados na análise ultraestrutural, que o formato longilíneo dos microvilos de indivíduos diabéticos podem representar maior taxa de absorção de água, excluindo a possibilidade de esta ser a causa da ocorrência de diarreia, sintoma bastante comum durante o desenvolvimento do diabetes tipo I. O exato significado funcional destas mudanças, contudo, permanece sem explicação, considerando-se a inexistência de literatura a esse respeito. Formas aberrantes e ausência de microvilosidades não foram observadas. O exercício físico, por sua vez, não foi responsável por melhoras neste quadro de modificações.

A mucosa intestinal está constantemente exposta a uma variedade de microrganismos, antígenos alimentares e toxinas, cabendo ao epitélio intestinal discriminar organismos patogênicos dos não-patogênicos, bem como antígenos, tolerando a flora comensal que mantém a homeostase da mucosa e controlando respostas inflamatórias (VAARALA; ATKINSON; NEU, 2008). Aumento característico na permeabilidade intestinal foi diagnosticado no cólon de indivíduos diabéticos e está relacionado à elevação dos níveis plasmáticos de zonulina, uma protease que inicia uma cascata de reações culminando no rearranjo do citoesqueleto e abertura de junções de oclusão das células epiteliais, com a conseqüente absorção contínua de antígenos não-próprios (SAPONE et al, 2003; DAMCI et al, 2003; NEU et al, 2005; CATASSI, NOBILE, BIAGIONI, 2006; DESSEIN, PEYRIN-BIROULET, CHAMAILLARD, 2009). Assim, pode permitir a passagem paracelular de antígenos luminiais para o sangue, com conseqüentes reações autoimunes que, por sua vez, podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de algumas doenças, incluindo o diabetes tipo I (FEDORAK et al, 1987; SAPONE et al, 2003; SECONDULFO et al, 2004; CATASSI, NOBILE, BIAGIONI, 2006).

No intestino grosso, contudo, foi observado o oposto dos dados descritos pela literatura citada anteriormente. O que se notou foi a presença de junções de oclusão fortemente contrastadas em indivíduos diabéticos, evidenciando a presença marcante de grande quantidade de proteínas juncionais e sugerindo que a entrada de antígenos pela rota paracelular, devida à maior permeabilidade oriunda da desorganização das junções oclusivas, deve estar restrita às regiões do intestino delgado, descritas por alguns dos trabalhos citados anteriormente. Estes resultados também discordam da possibilidade de abertura das junções de oclusão no cólon, descrita principalmente por Sapone et al (2003). Este provável fechamento das junções no ápice das células epiteliais do cólon pode ser reflexo dos prejuízos

causados pelo diabetes nos indivíduos analisados. Além disso, a orientação da secção em microscopia eletrônica pode, também, ter sido a causa da visualização destas características, permitindo a observação de regiões em corte oblíquo, que podem ter passado a falsa impressão de maior intensidade de contraste. O exercício físico, por sua vez, não foi responsável pela melhora destas condições, tanto em indivíduos controle quanto em diabéticos.

As interdigitações da membrana plasmática lateral, no intestino grosso, não sofreram diferenças frente à prática de exercícios, em indivíduos controle. Em DS, contudo, foram observadas dilatações características nos espaços intercelulares, quando comparadas ao grupo CS. Diferentemente dos trabalhos de Secondulfo et al (2001 e 2004), não foram encontradas interdigitações abundantes ao longo da membrana lateral das células absortivas. No entanto, de acordo com trabalhos como o de Vaaralla; Atkinson; Neu (2008), as alterações em sua estrutura, em ratos diabéticos, podem refletir problemas referentes à permeabilidade intestinal a antígenos. No presente estudo, as junções oclusivas possivelmente não permitiriam a passagem paracelular de antígenos luminais, pelo fato de apresentarem grande quantidade de proteínas em sua constituição, detectadas pelo maior contraste em microscopia eletrônica de transmissão. Desta forma, estas dilatações na membrana lateral podem não estar relacionadas à permeabilidade celular a antígenos. Não se pode excluir, todavia, a importância destas modificações em nível ultraestrutural, em se tratando de prejuízos oriundos do diabetes tipo I. Seu correto significado em termos funcionais, contudo, ainda não está claro. O exercício físico, em DT, por sua vez, permitiu a amenização dos efeitos do diabetes, tornando estas estruturas mais semelhantes às dos indivíduos controle. Desta forma, se mostrou de grande importância na recuperação das características morfológicas das células absortivas, evidenciando seus benefícios no tratamento da doença.

Entre pacientes diabéticos, é comum a ocorrência de diarreia. A síndrome da diarreia diabética consiste de episódios crônicos intermitentes de diarreia, que geralmente pioram durante a noite, e está ocasionalmente associada à incontinência fecal (ÖZTÜRK, ALTAN, YILDIZOGLU-ARI, 1996; VIRALLY-MONOD et al, 1998; UNAL et al, 2008). Além disso, a diarreia crônica é mais frequente nos pacientes diabéticos tipo I do que nos diabéticos tipo II (LYSY; ISRAELI; GOLDIN, 1999), sendo que motilidade intestinal anormal ou secreção são postuladas como uma das suas causas mais prováveis (VALDOVINOS; CAMILLERI; ZIMMERMAN, 1993). As desordens no trânsito intestinal podem ocorrer em qualquer estágio do diabetes mellitus, com possível envolvimento de todo o intestino (FOLWACZNY et al, 1995).

Os resultados da análise das micrografias obtidas pela técnica PAS, que permitiu a observação do teor de carboidratos na secreção das células caliciformes, neste estudo, são apoiados por estes trabalhos. Em indivíduos DS, o teor de polissacarídeos totais nas secreções é aparentemente maior, fato suposto a partir da constatação de que a intensidade de reação nestes indivíduos foi maior que nos CS. Maior intensidade de reação com a técnica indica maior teor de carboidratos secretados, e este provável aumento na quantidade de carboidratos pode estar associado ao aumento na quantidade de secreção, embora estudos mais específicos, em termos de biologia molecular, se façam necessários para que se comprove definitivamente este fato. De qualquer forma, esta maior quantidade de secreção pode estar relacionada à ocorrência de diarreia, como proposto por Valdovinos, Camilleri e Zimmerman (1993). Além disso, este fato pode significar proteção mais efetiva do intestino, proporcionada pelo aumento na quantidade de muco no lúmen (GARTNER; HIAT, 2007), tendo-se em vista que ele se encontra debilitado pela doença.

A prática periódica de exercícios físicos, no entanto, não mostrou nenhum resultado realmente relevante neste quesito. Os indivíduos CS e CT apresentam mesma intensidade de reação com o PAS, o mesmo ocorrendo com os DS e DT. Desta forma, não é possível inferir a respeito desta variável no tratamento de indivíduos diabéticos tipo I, em relação às secreções do cólon.

No epitélio intestinal residem as células caliciformes, células exócrinas altamente polarizadas reconhecidas por seu acúmulo apical de grânulos de secreção (OLIVER; SPECIAN, 1991). As células caliciformes são as células especializadas na secreção de muco intestinal, um gel glicoprotéico complexo que cobre a superfície das vilosidades epiteliais e contribui significativamente para a proteção celular, oferecendo muitas vantagens ecológicas para a microbiota (VAARALA; ATKINSON; NEU, 2008). Alterações em sua morfologia, portanto, poderiam estar indicando maior taxa de síntese de muco e fornecer, desta forma, evidências para uma das possíveis causas da ocorrência de diarreia durante o diabetes.

Ultraestruturalmente, as células caliciformes não apresentaram variações em sua forma ou tamanho, bem como seus núcleos. Também não foram encontradas alterações nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático rugoso. No entanto, uma observação mais criteriosa revelou quantidades aparentemente maiores de cisternas do complexo de Golgi em indivíduos DS, indicando maior taxa de síntese de vesículas de secreção, e comprovando os resultados obtidos em microscopia de luz. Em virtude disto, estes resultados podem confirmar a hipótese de que o aumento na secreção intestinal pode ser considerado como uma das possíveis causas da ocorrência de diarreia entre indivíduos diabéticos, conforme postulado por

Valdovinos, Camilleri e Zimmerman (1993). Em indivíduos CT, não foram observadas mudanças nas taxas de secreção, quando comparados aos CS. O maior desenvolvimento das cisternas dos complexos de Golgi, neste grupo, está possivelmente relacionado à região de observação da célula, mais próxima do centro. Em DT, leve diminuição na quantidade de cisternas foi observada, indicando menor taxa de síntese de muco, e evidenciando a provável colaboração da prática de exercícios na redução dos sintomas do diabetes tipo I. Esta diminuição na síntese não é visível histologicamente.

Os mecanismos correlacionados à diarreia crônica, todavia, são multifatoriais e complexos. De acordo com a literatura, o crescimento bacteriano no intestino delgado, ou seja, a presença de uma população bacteriana em excesso na porção proximal do intestino, e a ocorrência de neuropatia autonômica parecem desempenhar um papel principal neste aspecto (VIRALLY-MONOD et al, 1998). Indivíduos diabéticos com neuropatia autonômica têm trânsito intestinal mais lento em todo o trato intestinal (KESHAVARZIAN, IBER, 1987; KAWAGISHI et al, 1992; ÖZTÜRK, ALTAN, YILDIZOGLU-ARI, 1996; NAKAHARA et al, 2002), incluindo o cólon (FORREST; PARSONS, 2003). Diabéticos com trânsito retardado em qualquer região gastrointestinal tendem a apresentar maior quantidade de sintomas gastrointestinais (IBER, 1993). O trânsito mais lento permitiria a proliferação de bactérias, o que pode explicar por que alguns indivíduos apresentam diarreia (SCARPELLO; GREAVES; SLADEN, 1976).

A análise da técnica PAS-Alcian Blue possibilitou a constatação de algumas diferenças pouco perceptíveis, porém de grande importância, no intestino grosso. Os indivíduos diabéticos apresentaram secreções aparentemente coradas em tom azulado mais intenso, indicando maior acidez em seu muco. Um estudo realizado com ratos induzidos por estreptozotocina, contudo, demonstrou que não existem diferenças detectáveis na acidez do muco de indivíduos sadios e diabéticos, sugerindo que não ocorrem mudanças nos carboidratos componentes da mucina intestinal (MANTLE et al, 1989). Além disso, como detectado por métodos histoquímicos, células caliciformes imaturas produzem mucinas neutras contendo pouco ácido siálico. Conforme elas se maturam, as mucinas se tornam gradativamente mais ácidas (OLIVER; SPECIAN, 1991).

O significado funcional desta alteração, em virtude do desenvolvimento do diabetes, e suas implicações nos indivíduos diabéticos, ainda é desconhecido, embora possa estar relacionado apenas às diferentes fases de maturação das células caliciformes. O exercício físico, por sua vez, também não foi responsável por alterações na acidez das secreções intestinais, nem em controles, nem em diabéticos.

Muitas doenças gastrointestinais podem mudar a estrutura das fibras colágenas no trato gastrointestinal. O conteúdo de colágeno e sua distribuição fora da célula estão intimamente relacionados a algumas doenças (ZENG et al, 2003; YU et al, 2004). A espessura do colágeno subepitelial, por exemplo, se mostrou significativamente maior no cólon de pacientes diabéticos e sem diarreia. Isso pode ter ocorrido devido às anormalidades no metabolismo da matriz extracelular, que são induzidas pela hiperglicemia em casos de diabetes mellitus (KANDEMIR et al, 1995; UNAL et al, 2008). Em tecidos de cicatrização no cólon, contudo, as fibras colágenas encontram-se desarranjadas, menores e mais estreitas (ORTOLAN et al, 2008).

Neste trabalho, foram analisadas, através da técnica Picrosirius-Hematoxilina, as regiões da submucosa e lâmina própria de tecido conjuntivo. Ambas as regiões mostraram diminuição em seus teores de colágeno em indivíduos diabéticos, quando comparadas aos saudáveis. O arranjo helicoidal das fibras colágenas na submucosa é de fundamental importância na biomecânica de qualquer porção de órgãos tubulares, já que permite distensão longitudinal e transversal enquanto limita a distensão excessiva nas duas instâncias (MENDONÇA; CARVALHO; SOUZA, 1993). Desta forma, a diminuição na quantidade de fibras, indicada pela menor intensidade de reação, estaria prejudicando a propriedade de distensão do intestino grosso, podendo, inclusive, ser responsável por alterações no trânsito intestinal.

A camada de colágeno, na lâmina própria do cólon, participa da regulação do transporte de água e de eletrólitos do compartimento intercelular do epitélio para o compartimento celular (ROSS; PAWLINA, 2008). As alterações observadas nesta região, desta forma, poderiam estar prejudicando de alguma forma o intestino grosso, com a diminuição nos níveis de colágeno em diabéticos. O exercício físico, contudo, não promoveu alterações relevantes nesta região. Na submucosa de indivíduos diabéticos treinados um pequeno aumento no teor de colágeno foi observado, indicando possível melhora nas condições diabéticas, e possibilitando aos treinados maior possibilidade de retornar às condições intestinais consideradas normais.

A análise das micrografias obtidas a partir da técnica histoquímica Xilidine-Ponceau, para a visualização de proteínas teciduais, não permitiu a observação de alterações expressivas entre os diferentes grupos, em nenhum quesito (diabetes e exercício físico).

## 2.7. CONCLUSÃO

Algumas alterações morfológicas e bioquímicas foram observadas no intestino grosso de ratos diabéticos tipo I. Este fato relaciona-se, principalmente, à quantidade de carboidratos constituintes das mucinas, secretadas pelas células caliciformes, e ao teor de fibras colágenas na submucosa e lâmina própria de tecido conjuntivo, fatos que podem estar relacionados aos problemas de motilidade intestinal, que levam a sintomas como constipação e diarreia. Ultraestruturalmente, poucas alterações foram detectadas, apenas com relação à estruturação das junções oclusivas, interdigitações da membrana plasmática lateral e microvilosidades, nas células absortivas, e ao aumento na quantidade de cisternas do complexo de Golgi, nas células caliciformes.

A prática regular de exercícios físicos, por sua vez, mostrou eficiência no tratamento das disfunções intestinais e de suas alterações morfológicas. Foi responsável pela amenização da perda de fibras de colágeno na submucosa, e por benefícios ultraestruturais importantes, como recuperação da morfologia das interdigitações das células absortivas e diminuição da quantidade de cisternas do complexo de Golgi nas células caliciformes.



## 2.8. BIBLIOGRAFIA

- BATTLE, W.M. et al. Colonic dysfunction in diabetes mellitus. **Gastroenterology**, v.79, n.6, p.1217-1221, 1980.
  
- BYTZER, P.; TEGLBJAERG, P.S. Helicobacter pylori-negative duodenal ulcers: prevalence, clinical characteristics, and prognosis-results from a randomized trial with 2-year follow-up. **The American Journal of Gastroenterology**, v.96, n.5, p.1409-1416, 2001.
  
- CATASSI, C.; NOBILE, S.; BIAGIONI, M. The pathogenetical role of intestinal permeability in type 1 diabetes. **Digestive and Liver Disease**, v.38, p.A92-A93, 2006.
  
- DAMCI, T. et al. Increased intestinal permeability as a cause of fluctuating postprandial blood glucose levels in Type I diabetic patients. **European Journal of Clinical Investigation**, v.33, p.391-401, 2003.
  
- DESSEIN, R.; PEYRIN-BIROULET, L.; CHAMAILLARD, M. Intestinal Microbiota Gives a Nod to the Hygiene Hypothesis in Type 1 Diabetes. **Gastroenterology**, v.137, n.1, p.381-383, 2009.
  
- FEDORAK, R.N. et al. Altered Na-dependent nutrient absorption in streptozocin-treated chronically diabetic rats. **J. Clin. Invest.**, v.79, p.1571-1578, 1987.
  
- FOLWACZNY, C. et al. Intestinal transit disorders in patients with type-1 and type-2 diabetes mellitus. **Gastroenterology**, v.108, n.4, p.A599-A599, 1995.
  
- FORREST, A.; PARSONS, M. The enhanced spontaneous activity of the diabetic colon is not the consequence of impaired inhibitory control mechanisms. **Autonomic & Autacoid Pharmacology**, v.23, p.149-158, 2003.
  
- GARTNER, L.P. & HIAT, J.L. **Tratado de Histologia em cores**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007.

- IBER, R.L. et al. Relation of symptoms to impaired stomach, small bowel, and colon motility in long-standing diabetes. **Dig Dis Sci**, v.38, n.1, p.45-50, 1993.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ª Edição, Editora Guanabara Koogan, 2008.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Editora Santos, 1983.
- KANDEMIR, O. et al. Colonic subepithelial collagenous thickening in diabetic patients. **Diseases of the Colon and Rectum**, v.38, n.10, p.1097-1100, 1995.
- KAWAGISHI, T. et al. Segmental gut transit in diabetes mellitus: effect of cisapride. **Diabetes Res Clin Pract.**, v.17, n.2, p.137-144, 1992.
- KESHAVARZIAN, A.; IBER, F.L. Gastrointestinal involvement in insulin-requiring diabetes mellitus. **J Clin Gastroenterol.**, v.9, n.6, p.685-692, 1987.
- LYSY, J.; ISRAELI, E.; GOLDIN, E. The prevalence of chronic diarrhea among diabetic patients. **The American Journal of Gastroenterology**, v.94, n.8, p.2165-2170, 1999.
- MANTLE, M. et al. Effects of streptozotocin-diabetes on rat intestinal mucin and goblet cells. **Gastroenterology**, v.97, n.1, p.68-75, 1989.
- MCANUFF, M.A. et al. Alterations in intestinal morphology of streptozotocin-induced diabetic rats fed Jamaican bitter yam (*Dioscorea polygonoides*) steroidal sapogenin extract. **Nutrition Research**, v.23, p. 1569-1577, 2003.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. **Prática de Biologia Celular**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1980.
- MENDONÇA, J.C.; CARVALHO, C.A.; SOUZA, R.R. Arrangement of the collagen and elastic fibers in the upper human duodenum. **Revista do Hospital das Clínicas**, v.48, n.1, p.13-16, 1993.
- NAKAHARA, M. et al. Deficiency of KIT-positive cells in the colon of patients with diabetes mellitus. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.19, p.666-670, 2002.

- NEU, J. et al. Changes in intestinal morphology and permeability in the biobreeding rat before the onset of type 1 diabetes. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.40, n.5, p.589-595, 2005.
- OLIVER, M.G.; SPECIAN, R.D. Cytoskeleton of intestinal goblet cells: role of microtubules in baseline secretion. **The American Journal of Physiology**, v.260, p.850-857, 1991.
- ORTOLAN, E.V.P. Microscopic, morphometric and ultrastructural analysis of anastomotic healing in the intestine of normal and diabetic rats. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v.116, n.4, p.198-202, 2008.
- ÖZTÜRK, Y.; ALTAN, V.M.; YILDIZOGLU-ARI, N. Duration-depenent changes in calcium responsiveness in the alloxan-diabetic rat intestine. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v.10, p.288-293, 1996.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high Ph eletron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of cell Biology**, p.208-212, 1963.
- ROSS, M.H.; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas**. 5ª Edição, São Paulo: Editora Panamericana, 2008.
- SAPONE, A. et al. Zonulin, an intestinal tight junction modulator, is involved in the pathogenesis of type I diabetes. **The American Journal of Gastroenterology**, v.98, n.9, p.S228-S228, 2003.
- SCARPELLO, J.H.; GREAVES, M.; SLADEN, G.E. Small intestinal transit in diabetics. **British Medical Journal**, v.2, p.1225-1226, 1976.
- SECONDULFO, M. et al. Barrier loss and ultrastructural changes of small bowel mucosa in type 1 Diabetes Mellitus (DM1). **Digestive and Liver Diseases**, v.33, p.A66-A66, 2001.
- SECONDULFO, M. et al. Ultrastructural mucosal alterations and increased intestinal permeability in non-celiac, type I diabetic patients. **Digestive and Liver Disease**, v.36, p.35-45, 2004.
- SOUTHWELL, B.R. Loss of interstitial cells of Cajal may be central to poor intestinal motility in diabetes mellitus. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.23, p.660-667, 2008.

- SPANGÉUS, A.; EL-SALHY, M. Large intestinal endocrine cells in non-obese diabetic mice. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v.12, p.321-327, 1998.
  
- UNAL, A. et al. Is increased colon subepithelial collagen layer thickness in diabetic patients related to collagenous colitis? An immunohistochemical study. **Pathology – Research and Practice**, v.204, p.537-544, 2008.
  
- VAARALA, O.; ATKINSON, M.A.; NEU, J. The complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. **Diabetes**, v.57, 2008.
  
- VALDOVINOS, M.A.; CAMILLERI, M.; ZIMMERMAN, B.R. Chronic diarrhea in diabetes mellitus: mechanisms and an approach to diagnosis and treatment. **Mayo Clinic proceedings**, v.68, n.7, p.691-702, 1993.
  
- VIRALLY-MONOD, M. et al. Chronic diarrhoea and diabetes mellitus: prevalence of small intestinal bacterial overgrowth. **Diabetes & Metabolism**, v.24, n.6, p.530-536, 1998.
  
- YU, J. et al. Quantitative analysis of collagen fiber angle in the submucosa of small intestine. **Computers in Biology and Medicine**, v.34, n.6, p.539-550, 2004.
  
- ZENG, Y. et al. Collagen fiber angle in the submucosa of small intestine and its application in Gastroenterology. **World Journal of Gastroenterology**, v.9, n.4, p.804-807, 2003.
  
- ZHAO, J.; NAKAGUCHI, T.; GREGERSEN, H. Biomechanical and histomorphometric colon remodelling in STZ-induced diabetic rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v.54, n.8, p.1636-1642, 2009.

# Anexo I

Peso Corporal.

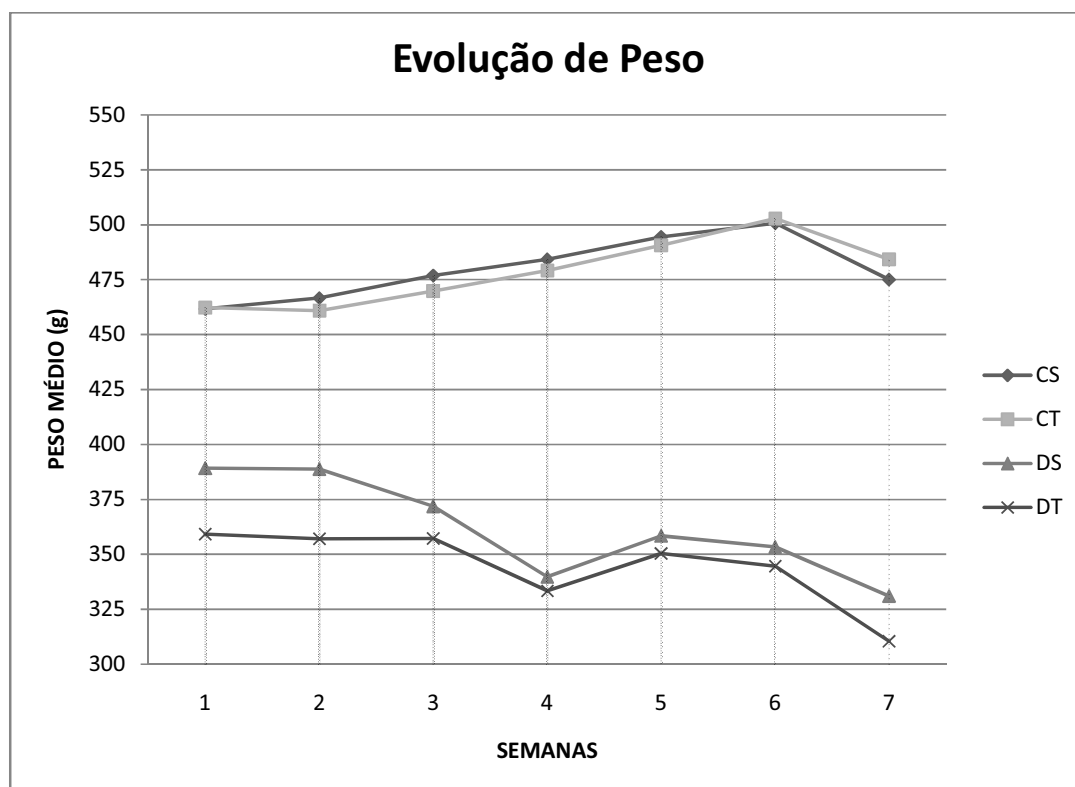
## PESO CORPORAL

Os valores médios do peso corporal semanal para cada grupo de tratamento, durante 7 semanas do período de estudo, estão apresentados na Tabela 1, e a evolução do peso corporal demonstrada no gráfico da Figura 1. Observa-se que os animais diabéticos sedentários apresentaram ganho de peso estatisticamente menor que os indivíduos controle, tanto sedentários quanto treinados, a partir da terceira semana de estudo ( $p < 0,05$ ). Não existem diferenças estatísticas significativas provenientes da prática de exercícios físicos, tanto em grupos controle quanto em diabéticos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1** – Peso corporal semanal médio (g) para cada grupo, durante 7 semanas.

Período	Peso Corporal Semanal Médio			
	Grupos			
	Controle Sedentário	Controle Treinado	Diabético Sedentário	Diabético Treinado
1ª Semana	461,7 ± 26,0	462,2 ± 54,0	389,2 ± 80,3	359,3 ± 62,3 <sup>a,b</sup>
2ª Semana	466,7 ± 27,3	460,9 ± 60,2	388,8 ± 92,8	357,1 ± 49,1 <sup>a,b</sup>
3ª Semana	476,9 ± 28,7	469,8 ± 57,2	371,9 ± 63,2 <sup>a,b</sup>	357,2 ± 47,6 <sup>a,b</sup>
4ª Semana	484,2 ± 32,3	479,1 ± 55,8	339,8 ± 102,7 <sup>a,b</sup>	333,5 ± 63,1 <sup>a,b</sup>
5ª Semana	494,4 ± 31,1	490,6 ± 65,0	358,4 ± 91,2 <sup>a,b</sup>	350,5 ± 47,7 <sup>a,b</sup>
6ª Semana	500,7 ± 30,8	502,9 ± 59,9	353,4 ± 100,7 <sup>a,b</sup>	344,6 ± 55,8 <sup>a,b</sup>
7ª Semana	475,0 ± 28,0	484,2 ± 61,9	331,1 ± 96,8 <sup>a,b</sup>	310,6 ± 58,9 <sup>a,b</sup>

**Legenda:** Valores expressos como média ± desvio padrão. a ≠ CS; b ≠ CT; c ≠ DS (ANOVA One-Way, *post-hoc* Bonferroni; Teste de Kruskal-Wallis, *post-hoc* Dunn;  $p < 0,05$ ).



**Figura 1.** Evolução do peso corporal (g), durante 7 semanas do período de estudo, dos animais dos grupos controle sedentário (CS; n = 8), controle treinado (CT; n = 8), diabético sedentário (DS; n = 8) e diabético treinado (DT; n = 8).

Os resultados obtidos a partir da análise das variações semanais de peso corporal estão de acordo com o esperado para indivíduos diabéticos sedentários, em comparação aos controle sedentários, ou seja, menor ganho de peso corporal, acompanhado de hipoinsulinemia e hiperglicemia. No entanto, a prática do protocolo de exercícios físicos não foi responsável por mudanças significativas em indivíduos controle, bem como em diabéticos. Isso corresponde ao inverso do que se supunha acontecer, já que se esperava que a perda de massa corporal fosse reduzida em virtude do treinamento físico.

# Anexo II

Glicemia.



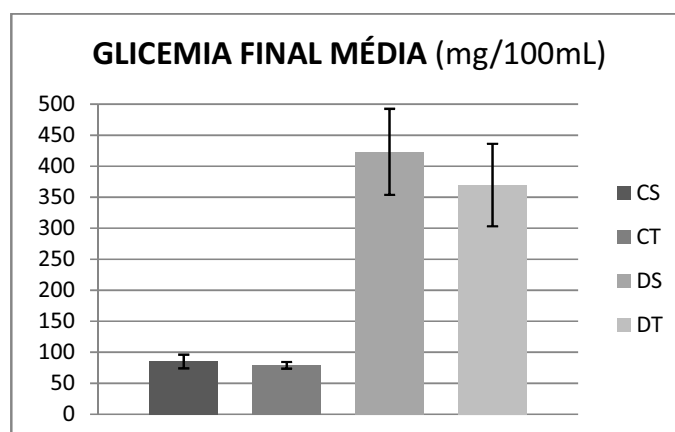
## GLICEMIA

Os valores referentes à glicemia média por grupo de tratamento são apresentados na Tabela 2 e Figura 2. Pode se observar aumento significativo nas concentrações de glicose no sangue de animais diabéticos, em comparação aos controles, confirmando a ocorrência de hiperglicemia, característica do diabetes. Não existe, contudo, diferenças estatisticamente relevantes entre os grupos no que diz respeito à prática de exercícios físicos, tanto em controles quanto em diabéticos.

**Tabela 1** – Glicemia média (mg/100mL de sangue) para cada grupo.

Parâmetro	Glicemia Final Média			
	Grupos			
	Controle Sedentário	Controle Treinado	Diabético Sedentário	Diabético Treinado
Glicemia	85,14 ± 11,10	79,14 ± 5,29	423,32 ± 69,45 <sup>a,b</sup>	369,68 ± 66,49 <sup>a,b</sup>

**Legenda:** Valores expressos como média ± desvio padrão. a ≠ CS; b ≠ CT; c ≠ DS  
(Teste de Kruskal-Wallis, *post-hoc* Dunn;  $p < 0,05$ ).



**Figura 1.** Glicemia média (mg/100mL de sangue) dos animais dos grupos controle sedentário (CS; n = 8), controle treinado (CT; n = 8), diabético sedentário (DS; n = 8) e diabético treinado (DT; n = 8).

Os resultados obtidos com relação à glicemia dos diferentes grupos de tratamento estão de acordo com o esperado, no que se refere aos efeitos do desenvolvimento do diabetes mellitus tipo I sem controle glicêmico, ou seja, maiores quantidades de açúcares no sangue (hiperglicemia). No entanto, não foi observada melhora no quadro de hiperglicemia diabética em virtude da prática de exercícios, resultado contrário ao que se esperava, na análise estatística. Observando-se as médias, contudo, podemos supor o aparecimento de benefícios provenientes da prática de um protocolo de treinamento, com diminuição nos níveis de glicose no sangue, mas o alto desvio padrão das amostras torna a comparação não significativa estatisticamente.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da análise dos resultados obtidos, pôde-se notar que os efeitos deletérios provenientes do diabetes tipo I sem controle glicêmico foram encontrados com grande frequência no fígado e intestino grosso de ratos machos Wistar. No fígado, este fato relaciona-se essencialmente às quantidades reduzidas nos estoques de glicogênio nos hepatócitos, à provável tendência à ocorrência de fibrose hepática nestes indivíduos, e às alterações nas quantidades de mitocôndrias e cisternas do retículo endoplasmático rugoso. No cólon, refere-se principalmente à intensidade de secreção, ao teor de colágenos na lâmina própria e submucosa, e às alterações nas células epiteliais intestinais absortivas e caliciformes.

A prática periódica de exercícios físicos regulares se mostrou muito importante no tratamento de diabéticos hipoinsulinêmicos, sendo atribuída a ela a amenização ou prevenção dos danos oriundos do desenvolvimento da doença, elevando, no fígado, os estoques de glicogênio, tornando-os mais próximos dos apresentados por indivíduos sadios sedentários, e reduzindo o risco de fibrose. No intestino grosso, promoveu melhoras significativas no quadro diabético, principalmente na recuperação do teor de colágeno nas camadas intestinais, que retornaram a níveis próximos dos considerados normais, e na tendência à redução dos sintomas gastrointestinais, como a diarreia.

**BIBLIOGRAFIA GERAL**

- ARKKILA, P.E.T. et al. Diabetic complications are associated with liver enzyme activities in people with type 1 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.52, p.113-118, 2001.
- BERNUAU, D. et al. Liver perisinusoidal fibrosis in BB rats with or without overt diabetes. **The American Journal of Pathology**, v.120, n.1, p.38-45, 1985.
- BROTMAN, D. J.; GIROD, J. P. The metabolic syndrome: a tug of war with no winner. **Cleve. Clin. J. Med.**, v.69, p.990-94, 2002.
- CHIPKIN, S.R.; KLUGH, S.A.; CHASAN-TABER, L. Exercise and diabetes. **Cardiology Clinics**, v.19, n.3, p.489-505, 2001.
- DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v.367, p.847-858, 2006.
- DE ANGELIS, K. et al. Efeitos fisiológicos do treinamento físico em pacientes portadores de diabetes tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.50, p.1005-1013, 2006.
- DE FEO, P. et al. Exercise and diabetes. **Acta Biomed**, v.1, p.14-17, 2006.
- EVANS, R.W.; LITTLER, T.R.; PEMBERTON, H.S. Glycogen storage in the liver in diabetes mellitus. **Journal of Clinical Pathology**, v.8, p.110-113, 1955.
- GIANNINI, C. et al. Role of physical exercise in children and adolescents with diabetes mellitus. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v.20, n.2, p.173-184, 2007.
- GOMES, R.J.; LEME, J.A.C.A.; MOURA, L.P.; ARAÚJO, M.B.; ROGATTO, G.; MOURA, R.F.; LUCIANO, E.; MELLO, M.A.R. Growth factors and glucose homeostasis in diabetic rats: effects of exercise training. **Cell Biochem Funct**, v.27, p.199-204, 2009.

- GOODYEAR, L.J.; HIRSHMAN, M.F.; HORTON, E.S. Exercise-induced translocation of skeletal muscle glucose transporters. **Am. J. Physiol.**, v. 261, p.795-799, 1991.
  
- HARDIN, D.S. et al. Mechanisms of enhanced insulin sensitivity in endurance-trained athletes: effects on blood flow and differential expression of GLUT4 in skeletal muscle. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 80, p.2437-2446, 1995.
  
- HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WILKEMAN, J. **Clinical chemistry, principles and techniques**. 2ª Edição, New York: Harper and Harper Row Publishes, 1974.
  
- KANDEMIR, O. et al. Colonic subepithelial collagenous thickening in diabetic patients. **Diseases of the Colon and Rectum**, v.38, n.10, p.1097-1100, 1995.
  
- KRAUS, W.E. et al. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. **N. Engl. J. Med.**, v. 374, p. 1483-1492, 2002.
  
- LEME, J.A.C.A. et al. Long-term physical training increases liver IGF-I in diabetic rats. **Growth Hormone and IGF Research**, v.19, p.262-266, 2009.
  
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v.51, p.216-226, 2008.
  
- LERCO, M.M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus induzido por aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.2, p.132-142, 2003.
  
- LUCIANO E. et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **Eur. J. Endocrinol.**, v.147, p.149-157, 2002.
  
- LUCIANO, E.; LIMA, F.B. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício agudo. **Revista de Ciências Biomédicas**, Botucatu, v.18, p.47-60, 1997.
  
- LUCIANO, E.; MELLO, M.A.R. Physical activity and protein metabolism in muscle from experimental diabetic rats. **Rev. Paul. Educ. Fis.**, v.12, p.202-209, 1998.
  
- MARTOCCHIA A. et al. Association of diffuse liver glycogenosis and mild focal macrovesicular steatosis in a patient with poorly controlled type 1 diabetes. **Intern. Emerg. Med.**, v.3, p.273-274, 2008.

- MUNNS, C.F.J. et al. Hepatic glycogenosis: reversible hepatomegaly in type 1 diabetes. **J. Paediatr. Child Health**, v.36, p.449-452, 2000.
- NIELSEN, J.N. et al. Glycogen synthase localization and activity in rat skeletal muscle is strongly dependent on glycogen content. **J. Physiol.**, v.531, p.757-769, 2001.
  
- STEPPEL, J.H.; HORTON, E.S. Exercise in the management of type 1 diabetes mellitus. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v.4, p.355-360, 2003.
  
- UNAL, A. et al. Is increased colon subepithelial collagen layer thickness in diabetic patients related to collagenous colitis? An immunohistochemical study. **Pathology – Research and Practice**, v.204, p.537-544, 2008.
  
- VALLANCE-OWEN, J. Liver glycogen in diabetes mellitus. **J. Clin. Path.**, v.5, p.42-52, 1952.
  
- WALLBERG-HENRIKSSON, H.; RINCON, J.; ZIERATH, J.R. Exercise in the management of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Sports Med.**, v.25, n.1, p.25-35, 1998.
  
- WEI, M. et al. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. **Heart, lung and circulation**, v.12, p.44-50, 2003.